



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA O
REPELENTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LOS HONGOS DE
NARANJAS *Citrus sinensis* SOBRE HORMIGAS *Lasius niger* DE
UNA FINCA ORGÁNICA DEL CHONTAL”**

Trabajo de titulación

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: TATIANA VANESSA DÁVILA PINO

TUTOR: DR. IVÁN RAMOS SEVILLA

Riobamba-Ecuador
2018

© 2018, Tatiana Vanessa Dávila Pino.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA O REPELENTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE LOS HONGOS DE NARANJAS *Citrus sinensis* SOBRE HORMIGAS *Lasius niger* DE UNA FINCA ORGÁNICA DEL CHONTAL, de responsabilidad de la señorita Tatiana Vanessa Dávila Pino, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Iván Ramos Sevilla

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

Ing. Hanníbal Brito, PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Tatiana Vanessa Dávila Pino, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Tatiana Vanessa Dávila Pino

C.I. 0604114397

DEDICATORIA

A mi pequeño ser de luz, que me ha enseñado la mejor manera de amar. Y a mi luz mayor, por darme fuerza cuando sentía que todo estaba perdido, por concederme nuevas oportunidades y hacerme ver lo bueno de la vida al mantenerme aquí y ahora para despertar cada mañana viendo la sonrisa más sincera del mundo.

AGRADECIMIENTO

A mis padres y hermanos, por creer en mí, a pesar de las caídas, me han apoyado hasta el final poniendo su esfuerzo y cariño.

A Anita, porque me dio más que su tiempo, por las palabras, los empujes, las idas y venidas para poder terminar este trabajo.

A mis amigas, que a pesar de las distancias sus mensajes, su colaboración y palabras de apoyo jamás faltaron.

A mi wisp, por ayudarme a construir y reconstruir un mundo.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a los docentes que han sido parte de mi formación académica, así como a quienes me guiaron para la realización y culminación de la presente investigación.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	3
OBJETIVOS.....	4

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1. Antecedentes de la investigación	5
1.2. Bases teóricas	7
1.2.1. <i>Plagas en cultivos</i>	7
1.2.1.1. <i>Tipos de plagas</i>	7
1.2.1.2. <i>Hormigas</i>	8
1.2.2. <i>Control de Plagas</i>	10
1.2.2.1. <i>Mecanismos para el manejo de plagas</i>	10
1.2.2.2. <i>Control biológico de Hormigas</i>	12
1.2.3. <i>Insecticidas naturales</i>	13
1.2.3.1. <i>Insecticidas de origen biológico</i>	14
1.2.3.2. <i>Insecticidas de origen botánico</i>	14
1.2.3.3. <i>Insecticidas de origen mineral</i>	15
1.2.4. <i>Repelentes Naturales</i>	16
1.2.5. <i>Cítricos</i>	16
1.2.5.1. <i>Naranja</i>	16
1.2.6. <i>Hongos fitopatógenos</i>	18
1.2.6.1. <i>Hongos en la cáscara de la naranja</i>	20
1.2.7. <i>Hongos entomopatógenos</i>	24
1.2.8. <i>Medios de cultivo y aislamiento</i>	25
1.2.8.1. <i>Agar Papa Dextrosa (PDA)</i>	25
1.2.8.2. <i>Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)</i>	25

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	27
2.1. Hipótesis y especificación de variables.....	27
2.1.1. <i>Hipótesis</i>	27
2.1.2. <i>Variables</i>	27

2.1.2.1.	<i>Variables Dependientes</i>	27
2.1.2.2.	<i>Variables Independientes</i>	27
2.2.	Tipo y Diseño de la investigación	28
2.3.	Técnicas de Recolección de datos	30
2.3.1.	Zona de Estudio	30
2.3.3.	Recolección de la muestra	31
2.3.4.	Primera etapa- Fase de laboratorio	31
2.3.4.1.	<i>Caracterización microbiológica</i>	31
2.3.4.2.	<i>Preparación de Soluciones</i>	34
2.3.5.	Segunda etapa – Fase de Campo	37
2.3.5.1.	<i>Identificación de rutas a los hormigueros</i>	37
2.3.5.2.	<i>Aspersión de las soluciones in vivo</i>	38
2.3.5.3.	<i>Observación directa de la acción de las soluciones sobre las hormigas</i>	38
2.3.6.	Análisis Estadístico	38
CAPÍTULO III		
3.	MARCO DE RESULTADOS	39
3.1.	Resultados, análisis y discusión	39
3.1.1.	Primera Etapa – Fase de Laboratorio	39
3.1.1.1.	<i>Caracterización microbiológica</i>	39
3.1.1.2.	<i>Preparación de las soluciones</i>	41
3.1.2.	Segunda etapa – Fase de Campo	43
3.1.2.1.	<i>Identificación de las rutas a los hormigueros</i>	43
3.1.2.2.	<i>Aspersión de las soluciones in vivo</i>	43
3.1.2.3.	<i>Observación directa de la acción de las soluciones sobre las hormigas</i>	45
3.1.3.	Análisis Estadístico	45
3.1.3.1.	<i>Porcentaje de Repelencia</i>	45
3.1.3.2.	<i>Porcentaje de Muertes</i>	48
CONCLUSIONES		54
RECOMENDACIONES		55
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Composición de abono compostado convencional usado en el control biológico de Hormigas Arrieras.....	11
Tabla 2-1: Cuadro comparativo entre insecticidas químicos vs insecticidas naturales.	15
Tabla 3-1: Partes típicas de un Hongo Fitopatógeno.	19
Tabla 4-1. Composición de Agar Papa Dextrosa (PDA)	25
Tabla 5-1: Composición de Sabouraud Dextrosa Agar (SDA).....	26
Tabla 1-2: Diseño Experimental	29
Tabla 2-2: Preparación de solución stock de Cloranfenicol.....	32
Tabla 3-2: Desinfección de las cortezas	34
Tabla 4-2: Preparación de soluciones a partir de cáscaras de naranjas	35
Tabla 5-2: Preparación de medio líquido Papa Dextrosa.....	35
Tabla 1-3: Concentración de las soluciones preparadas a partir de cáscaras de naranjas.....	41
Tabla 2-3: Conteo de esporas en el medio líquido PD.....	42
Tabla 3-3: Esporas en las soluciones a partir del asilamiento.....	42
Tabla 4-3: Promedio del porcentaje de repelencia y muerte en las horas establecidas	43
Tabla 5-3: Promedio del porcentaje de repelencia de las soluciones aplicadas a diferente concentración	44
Tabla 6-3: Promedio del porcentaje de muertes de las soluciones aplicadas a diferente concentración	44
Tabla 7-3: Estadísticos descriptivos del porcentaje de repelencia y porcentaje de muerte frente a las soluciones aplicadas.....	45
Tabla 8-3: Pruebas de efectos inter-sujetos para porcentaje de Repelencia	46
Tabla 9-3: Subconjuntos homogéneos del % de repelencia frente a las soluciones aplicadas ...	47
Tabla 10-3: Pruebas de efectos inter-sujetos para Porcentaje de Muertes	49
Tabla 11-3: Pruebas ANOVA para las concentraciones de la solución Th.....	50
Tabla 12-3: Subconjuntos homogéneos del porcentaje de repelencia de Th frente a la concentración aplicada	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Hongos entomopatógenos sobre hormiga.....	13
Figura 2-1: Partes de la cáscara de la naranja.....	17
Figura 3-1: <i>Penicillium digitatum</i> en naranja, en cultivo y bajo el microscopio	21
Figura 4-1: <i>Penicillium italicum</i> en cítricos y bajo el microscopio	22
Figura 5-1: <i>Diplodia natalensis</i>	22
Figura 6-1: <i>Botrytis cinerea</i> en cítricos.....	23
Figura 7- 1: <i>Diaporthe citri</i> en fruto y hojas	23
Figura 8-1: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en cítricos.	24
Figura 9-1: Agar Papa Dextrosa.....	25
Figura 10-1: Agar Dextrosa Sabouraud	26
Figura 1-2: Esquema de las diluciones en serie y siembra en superficie.	33
Figura 1-3: Crecimiento de la dilución 10^{-3} en Agar Sabouraud.	39
Figura 2-3: Crecimiento de hongos a partir de tejidos infectados.	40
Figura 3-3: Aislamiento de <i>Penicillium</i> spp en agar Sabouraud.....	40
Figura 4-3: <i>Penicillium</i> spp visto al microscopio.....	41

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Porcentaje de Repelencia vs Soluciones Aplicadas.....	48
Gráfico 2-3: Porcentaje de Muertes vs Soluciones Aplicadas	50

RESUMEN

Este trabajo de titulación tuvo como objetivo determinar la actividad insecticida o repelente del extracto acuoso de los hongos de naranjas *Citrus sinensis* sobre hormigas *Lasius niger* de una finca orgánica del Chontal en la provincia de Imbabura, para lo cual se realizó en dos fases: La primera consistió en la elaboración de las soluciones y caracterización microbiológica en condiciones de laboratorio, se usaron dos medios de cultivo selectivos para hongos Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) y un medio de masificación líquido Papa Dextrosa (PD). Además, se prepararon tres soluciones experimentales: Th (Extracto acuoso de cáscaras de naranjas infectadas por hongos), Tn (Extracto acuoso de cáscaras de naranjas sanas), Ta (solución del inóculo de hongo aislado). A partir de ellas se realizaron tres diluciones para obtener tres concentraciones al 100%, 50%, y 25%, adicionalmente se probó un control negativo con agua simple y un control positivo con hormiguicida. La segunda fase consistió en las pruebas *in vivo* realizadas en las rutas de hormigueros de la comuna del Chontal. Se escogieron 15 rutas y se aplicó cada solución por triplicado durante tres días. Se contabilizó el número de hormigas antes y después de cada aplicación. Las especies de hongos presentes en las cáscaras de naranja pertenecen al género *Penicillium* spp. Las soluciones Th, Tn y Ta presentaron un porcentaje de repelencia del 67,79%; 54,18% y 8,79 respectivamente, en tanto al porcentaje de muertes fue 8,32%; 3,58%; 1,49%; para cada solución. Este estudio concluye que las soluciones acuosas preparadas a partir de cáscaras de naranjas infectadas por *Penicillium* spp presentan una acción fundamentalmente repelente sobre las hormigas lo que difiere de los insecticidas que provocan su muerte. Se recomienda ampliar la investigación sobre el uso potencial del bioinsecticida, en tanto a dosis y tiempo de exposición sobre las hormigas y su posible comercialización.

Palabras clave: <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA INGENIERÍA>, <HORMIGA (*Lasius niger*)>, <ACTIVIDAD REPELENTE>, <ACTIVIDAD INSECTICIDA>, <HONGO (*Penicillium*)>, <EXTRACTO ACUOSO>, <MICROBIOLOGÍA>, <BIOTECNOLOGÍA>, <RESIDUOS DE NARANJA (*Citrus sinensis*)>

SUMMARY

The purpose of this research work was to determine the insecticidal or repellent activity of the aqueous extract of the orange fungus *Citrus sinensis* on *Lasius niger* ants in an organic farm in El Chontal of Imbabura province, for which it was carried out in two phases: the first one consisted in the elaboration of the solutions and microbiological characterization under laboratory conditions, there, two selective culture media were used for Potato Dextrose Agar (PDA) fungi and Sabouraud Dextrose Agar (SDA) and a the Potato Dextrose (PD) liquid mass. In addition, three experimental solutions were prepared: Th (aqueous extract of fungal infected orange peel). Tn (aqueous extract of healthy orange peel), Ta (solution of isolated fungus inoculum), from these, three dilutions were made to obtain three concentrations at 100%, 50% and 25%, additionally, a negative control with simple water and a positive control with antidust was tested. The second phase consisted of the *in vivo* tests carried out on the anthill routes of El Chontal community. The number of ants was counted before and after each application. The species of fungi present in the orange peels belong to the genus *Penicillium* spp. The solutions Th, Tn and Ta presented a repellence percentage of 67,79%; 54,18% and 8,79 respectively, while the percentage of deaths was 8,32%; 3,58%; 1,49%; for each solution. This study concludes that aqueous solutions prepared from peels of orange infected by *Penicillium* spp have a fundamentally repellent action on ants, which differs from the insecticides that cause their death. It is recommended to expand the research on the potential use of this bioinsecticide, in both dose and time of exposure on the ants their possible commercialization.

Keywords: <ENGINEERING TECHNOLOGY AND SCIENCE>, <ANT (*Lasius niger*)>, <REPELENT ACTIVITY>, <INSECTICIDE ACTIVITY>, <FUNGO (*Penicillium*)>, <AQUEOUS EXTRACT>, <MICROBIOLOGY>, <BIOTECHNOLOGY>, <ORANGE RESIDUES (*Citrus sinensis*)>.

INTRODUCCIÓN

Los insecticidas considerados como plaguicidas disminuyen o evitan la reproducción de plagas, optimizando el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Aquellos cuya composición es de origen netamente químico además de combatir las plagas, provocan perjuicios en la salud humana y serios daños ambientales, ya que pueden llegar a ser altamente contaminantes debido a las grandes concentraciones con las que son expuestos al ambiente. (Montaña et al. 2009)

La agricultura es una actividad de gran importancia en muchos países del mundo, donde el consumo de plaguicidas ha ido aumentando en las últimas décadas con el afán de mejorar la tecnología agrícola e incrementar la producción. Las plagas van mostrando resistencia hacia los insecticidas, lo que hace que cada vez se los usen en mayor cantidad y en formulaciones con concentraciones más elevadas, lo que implica un aumento a los daños ambientales y al deterioro de la salud humana y animal. (Montaña et al. 2009)

Como consecuencia de esta problemática, algunos productores y empresas comienzan a enfocarse en la implementación de nuevas prácticas agrícolas que garantizan un mejor manejo del suelo, el uso de insumos no contaminantes entre otros.

En Ecuador, se utiliza gran cantidad de agroquímicos en los cultivos. Un estudio realizado por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador se menciona que: “El 47% de hectáreas de superficie agrícola en el Ecuador, utiliza algún tipo de plaguicida químico en sus cultivos, de los cuales el 37% están próximos a cuerpos de agua; El 53% restante se cultiva de manera ecológica, es decir utilizan pesticidas orgánicos o no utilizan pesticidas.” (Arias, 2013, pp. 10-17)

En la comuna Chontal parroquia García Moreno de la provincia de Imbabura, existe una finca orgánica donde los agricultores han desarrollado todos sus conocimientos ancestrales para no incursionar en el uso de pesticidas sintéticos, y producir con sus propios recursos productos naturales que les permita el control de plagas e insectos.

Uno de los problemas que afrontan los agricultores orgánicos del Chontal, es el referente a las hormigas, las cuales son colonias organizadas que atacan a los vegetales en desarrollo antes de la floración, destruyendo las terminales de las ramas con lo cual no existe producción de frutos. Es por ello, que se genera inconvenientes para su economía que depende de dicha producción.

En las fincas agroecológicas de la zona el conocimiento ancestral les ha permitido utilizar las cáscaras de las naranjas con presencia del llamado “moho verde”, las mismas que disueltas en agua, forman un extracto el cual es utilizado como control biológico de las hormigas que disminuyen la producción de los cultivos.

A través de la presente investigación se prepararon soluciones orgánicas destinadas a utilizarse como insecticidas biológicos para el control de las hormigas que atacan a los cultivos de la finca orgánica del Chontal.

JUSTIFICACIÓN

En las fincas agroecológicas de la zona del Chontal, las hormigas como colonias atacan los cultivos de cacao, maracuyá, yuca entre otros, lo que ocasiona daños en la producción con los consecuentes impactos en la economía.

Los agricultores de la zona en base a sus conocimientos ancestrales, vienen utilizando las cáscaras con hongos de color verde azulado que se forman en las naranjas maduras que han caído al suelo, para preparar extractos acuosos que posteriormente son utilizados sobre las hormigas presentes en los cultivos, logrando detener su ataque. Debido a ello, es importante comprobar si el extracto preparado por los agricultores actúa como insecticida o como repelente en las hormigas, determinar las especies de hongos que actúan y en qué proporción debe aplicarse.

El desarrollo de la investigación contribuirá a mejorar la calidad y salud ambiental de la población. Como así se lo estipula en la Constitución Ecuatoriana, Derechos del Buen Vivir, en su segunda sección, Art. 14“Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, sumakkawsay. Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados”.

Por ello la importancia de esta investigación radicó en demostrar la efectividad del uso de insecticidas de origen biológico, como una alternativa amigable para el ambiente, personas y animales, además de ser económicamente rentable para el agricultor ya que se aprovecharán los desechos orgánicos generados en sus fincas siendo en este caso las naranjas maduras que se encuentran en proceso de descomposición de la finca orgánica del Chontal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad insecticida o repelente del extracto acuoso de los hongos de naranjas *Citrus sinensis* sobre hormigas *Lasius niger* de una finca orgánica del Chontal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extractos acuosos a partir de las muestras de naranjas provenientes de la finca orgánica del Chontal.
- Aislar y caracterizar las especies de hongos presentes en las soluciones.
- Evaluar in vivo la actividad insecticida o repelente de las soluciones preparadas sobre las hormigas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

Para realizar la investigación se partió por el concepto de que los insecticidas y repelentes de origen orgánico no afectan al medio ambiente y tampoco a la salud de los seres vivos. En base a este punto se toma en cuenta algunas evidencias en relación a técnicas usadas para el control de hormigas en los cultivos:

El aceite esencial de naranja es útil para eliminación de los insectos de cuerpo blando. También es efectivo al ser rociado directamente sobre las plagas de hormigas y cucarachas. (Espitia, 2011)

La preparación de una solución a base de residuos de café pasado, pimienta, canela, clavo de olor y ajo, permite repeler hormigas, en este caso los principios activos serán la cafeína, piperina, alina, ajoeno, eugenol que afectan directamente a la piel de las hormigas y las repele, cambiando su rumbo. (Nava, et al. 2012)

En estudios relacionados a la acción insecticida o repelente de plantas sobre hormigas que atacan a cultivos se pueden mencionar el realizado en Buenos Aires por Caffarini et al (2008), en el cual se ensayó en laboratorio la respuesta a extractos acetónicos de ricino, paraíso y trichillia. Dando como resultado que los extractos de risino y paraíso poseen un mayor efecto repelente sobre las hormigas.

En cuanto al uso potencial de hongos entomopatógenos para el control de hormigas, se puede mencionar al realizado en el municipio de Lloró – Chocó (Colombia). En la cual se examinaron cepas de hongos nativos obtenidos de hormigas muertas y de los desechos producidos por ellas, de los cuales se aislaron 21 cepas, mismas que fueron evaluadas sobre hormigas en el laboratorio. Se compararon los aislamientos en cuanto a la mortalidad acumulada. Dos de los

aislamientos de *Metarhizium sp.*, alcanzaron 100% de mortalidad al quinto día de inoculación. (Córdova, 2011)

Un experimento realizado en la División de Floricultura de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional de Asunción (UNA), ubicado en San Lorenzo – Paraguay, cuyo objetivo fue evaluar la eficacia de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control de hormigas. Fueron seleccionados 100 nidos de hormigas para la aplicación de las formulaciones a base de los entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y la mezcla de ambos hongos. Al final de las evaluaciones determinaron si hubo actividad en el interior de los nidos. En el momento de la evaluación observaron cámaras vacías y restos de pajas. De las pruebas obtuvieron mejores resultados con la dosis de 20 g de *Beauveria bassiana* con 80% de eficacia, la dosis de 20g de *Metarhizium anisopliae* y la mezcla de ambos hongos en la misma dosis presentó 70% de eficacia. (Amarilla & Arias, 2013)

En Taumalipas México se realizó la tesis denominada “Fluctuación Poblacional del Hongo entomopatógeno *Hirsutella citriformis* en poblaciones del psílido asiático *Diaphorina citri* en un huerto de naranja” en el cual se monitorearon quincenalmente a los insectos enfermos y sanos, para calcular el porcentaje de mortalidad que provoca el hongo, como medio de control biológico. Desarrollando un mayor efecto insecticida a una temperatura de 24°. (Cabrera, 2012)

En un estudio realizado por Peris et al. (2015) Se determinó la interacción del hongo *Penicillium digitatum* sobre naranjas *Citrus* y la preferencia de frugívoros por los ejemplares infectados. Uno de los resultados de su investigación propuso que los hongos liberan metabolitos secundarios. Por ejemplo, a medida que se desarrolla el hongo *P. digitatum* se produce etileno en los frutos cítricos infectados (Achilea et al. 1985). Estos nuevos compuestos generados a partir de la infección son muy volátiles y emiten aromas fuertes.

En la revista Ciencia y Tecnología Alimentaria se publicó el artículo realizado por Ochoa, et al (2007) sobre el Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis*. En donde aislaron e identificaron morfológicamente *Penicillium* spp. Mediante la identificación moleculares las especies encontradas fueron *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. variable*.

Con todas estas investigaciones se parte para realizar la determinación de la actividad insecticida o repelente de los hongos presentes en los extractos acuosos de las cáscaras de naranjas de la finca orgánica del Chontal sobre hormigas.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Plagas en cultivos

Las plagas presentes en los cultivos, viven todo su ciclo o parte de él en el suelo y corresponden a organismos tales como microorganismos, animales y plantas (patógenos, insectos o maleza) que compiten con el hombre por los alimentos que producen, es decir que su abundancia afecta a los bienes del ser humano (Coto y Saunders, 2004, p.5). Este crecimiento excesivo puede llevar a la destrucción completa o parcial de un cultivo, provocando una reducción en el valor del producto en el mercado (Saunders et al, 1998, p.6). Dependiendo del tipo de plaga, éstas pueden atacar a las semillas en germinación, a las raíces o su vez a las partes aéreas de las plantas cultivadas, por la misma razón se puede evidenciar la pérdida de producción y problemas socio-económicos (Jiménez, 2016, p. 6).

1.2.1.1. Tipos de plagas

Según Coto y Saunders (2004, pp.5-6) las plagas de los cultivos agrícolas se pueden dividir en cuatro grupos, tomando en cuenta su importancia y conducta en el campo:

Plagas primarias

También llamadas plagas claves, están casi siempre presentes en cada temporada del cultivo. Pueden ocasionar pérdidas económicas y por ende se deben aplicar medidas para su combate.

Brotos

Pueden aparecer en un grado bajo o imperceptible, pero si el clima es favorable, podrían llegar a aumentar de forma súbita y masiva. Se pueden presentar invasiones externas en el mismo cultivo o en hospedantes, las mismas que suelen ser locales y breves presentándose en el mismo periodo del año.

Plagas secundarias

Suelen presentarse en bajas cantidades, debido a la acción de sus enemigos naturales. No causan daños importantes durante un prolongado periodo de tiempo debido a la presencia de sus enemigos naturales, pero aun así se deben aplicar medidas de combate en los siguientes casos:

- Las condiciones climáticas y fertilidad del suelo amplían el periodo de susceptibilidad, ocasionando un efecto acumulativo.
- Por la acción combinada con plagas menores
- Por el uso excesivo de insecticidas que ha afectado al combate natural provocando el resurgimiento de las plagas.
- Cuando las condiciones ambientales se vuelven propicias para las plagas más que para sus enemigos naturales

Vectores

Causan poco o un daño nulo por si solos, pero son importantes a baja densidad por su capacidad de transmitir enfermedades de las plantas.

1.2.1.2. Hormigas

Las hormigas son insectos que presentan características únicas. En el mundo se conocen más de 10.000 especies de hormigas. Habitan en su mayoría los bosques tropicales, donde incluso pueden llegar a ser hasta la mitad de la población de todos los insectos. (National Geographic, 2010). Su abundancia y su impacto sobre la mayoría de los ecosistemas terrestres las convierte en una verdadera especie clave de estudio, que tiene efectos directos e indirectos sobre la biodiversidad de las comunidades terrestres. (Hölldobler & Wilson, 1990).

La abundancia de hormigas que viven en el suelo en diferentes paisajes agrícolas, las convierte en una especie dominante, que pueden tener efectos positivos en la génesis del suelo y en la regulación del número de insectos, incluidos insectos plaga de cultivos agrícolas. Específicamente, las hormigas son beneficiosas porque:

- a) Son componentes importantes en diferentes ecosistemas
- b) Sus habilidades para mover el suelo las hacen importantes en el ciclo de los nutrientes
- c) Consumen grandes cantidades de comida de presa, incluidos insectos plaga
- d) Son buenos polinizadores de bayas silvestres
- e) Distribuyen semillas, incluidas semillas de malezas y mejoran su germinación en las comunidades forestales, aumentando la diversidad de plantas de paisajes naturales.

Es decir que muchas especies de hormigas son beneficiosas gracias en su papel como depredadores de plagas o recicladores de nutrientes importantes. Pero las hormigas se convierten en plagas si molestan a los trabajadores que manipulan plantas infestadas o cuando sus actividades aumentan las poblaciones de plagas, por ejemplo, al interferir con los controles fisiológicos. (Lind et al, 2006).

Hormigas *Lasius niger*

Las hormigas *Lasius niger* también pueden llegar a ser una plaga. Son vecinos problemáticos en patios, casas, invernaderos y colmenas, son invasores ya que se dedican a la recolección de alimentos y fomentan el crecimiento áfidos en las plantas cultivadas, causando daños y disminuyendo el rendimiento de los cultivos.

En baja intensidad agrícola, el número de colonias de hormigas negras aumenta rápidamente y el tamaño de los montículos de nidos aumenta de manera persistente en las áreas en barbecho. De esa forma, las hormigas pueden convertirse en una molestia al construir montículos o pequeñas colinas en huertos, jardines frontales, prados, prados arbolados, pastizales viejos, pastizales y en el césped, inhibiendo el corte. En los jardines de abejas, las hormigas pueblan las colmenas, convirtiéndose en molestias para la colonia de abejas y disminuyendo la producción de miel (Lind et al, 2006). Aunque *L. niger* no está bajo protección, vale la pena conservar sus nidos ya que son entomófagos importantes en las comunidades naturales, lo que tiene un efecto positivo en los cultivos que crecen en sus cercanías (Frouz et al, 2003).

1.2.2. Control de Plagas

Manejo Integrado de Plagas (MIP)

La Universidad de California en su programa estatal de MIP, lo define como:

El MPI es una estrategia que se centra en la prevención a largo plazo de las plagas o su daño mediante una combinación de técnicas como el control biológico, la manipulación del hábitat, la modificación de las prácticas culturales y el uso de variedades resistentes. Los pesticidas se usan solo después de que el monitoreo indique que se necesitan según las pautas establecidas. Los tratamientos se realizan con el objetivo de eliminar solo el organismo objeto. Los materiales de control de plagas se seleccionan y aplican de una manera que minimiza los riesgos para la salud humana, los organismos beneficiosos y el medio ambiente (University of California, 2013).

Coto y Saunders (2004, p.6) consideran al MPI como el uso inteligente de los recursos útiles para disminuir las densidades de plagas, en el cual el daño causado no justifique el costo o el esfuerzo de ejecutar acciones de combate adicionales.

1.2.2.1. Mecanismos para el manejo de plagas

Los programas de MPI combinan enfoques de gestión para una mayor efectividad, siendo la manera más efectiva para manejar plagas a largo plazo es mediante el uso de una combinación de métodos que funcionan mejor juntos que por separado. Los enfoques para el manejo de plagas a menudo se agrupan en las siguientes categorías. (University of California, 2013).

Controles mecánicos y físicos

Son aquellos que matan a una plaga directamente, bloquean las plagas o hacen que el entorno no sea adecuado para ello. Los controles físicos incluyen coberturas para el manejo de malezas, esterilización con vapor del suelo para el manejo de enfermedades o barreras tales como pantallas para mantener a las aves o insectos fuera.

Control químico

Se refiere al uso de pesticidas. En IPM, los pesticidas se usan solo cuando es necesario y en combinación con otros enfoques para un control más efectivo y a largo plazo. Los pesticidas se seleccionan y se aplican de una manera que minimice su posible daño a personas, organismos no objeto y el medio ambiente.

Controles culturales

Son prácticas que reducen el establecimiento, la reproducción, la dispersión y la supervivencia de las plagas. Por ejemplo, cambiar las prácticas de riego puede reducir los problemas de plagas, ya que demasiada agua puede aumentar la enfermedad de las raíces y las malas hierbas.

Control Orgánico (Compostaje)

Hace referencias a prácticas en la que se intenta mezclar una serie de componentes orgánicos de uso común junto con estiércol de animales para obtener un compostaje el cual será utilizado sobre el hormiguero que se desea “matar”. Adicionalmente, contar con una estopa o un plástico con una capacidad suficientemente amplia para cubrir el hormiguero compostado en su totalidad; como opción alternativa a estos materiales es posible cubrir el hormiguero con su misma tierra. (Baddii et al, 2000)

Tabla 1-1: Composición de abono compostado convencional usado en el control biológico de Hormigas Arrieras

Tierra de hormiguero + Estiércol de cualquier animal	Se mezcla en las mismas cantidades
Cascarillas, cáscaras, desyerbas, hojas u otra fuente de materia orgánica fresca, pulpa de café, etc.	En peso hasta donde se pueda
Miel de purga o melaza 3 kilos Levadura fresca de panadería ¼ libra	Por hormiguero

Fuente: Guillade, 2017

Realizado por: Tatiana Dávila, 2018

Este tipo de control presenta varias ventajas ambientalmente, debido a que su aplicación incrementa la fertilidad del suelo, restituye el equilibrio de la actividad microbiana e incluso mejora la estructura de la capacidad de intercambio catiónico del suelo lo que a su vez aumenta la tolerancia y resistencia a la acción de enfermedades y plagas en las plantas, gracias a una nutrición orgánica equilibrada. (Guillade, A. C., 2017)

Control biológico

Es el uso de enemigos naturales (depredadores, parásitos, entomopatógenos y competidores) para controlar las plagas y su daño. Los invertebrados, los patógenos de las plantas, los nematodos, las malezas y los vertebrados tienen varios enemigos naturales. (University of California, 2013). El control biológico a su vez hace alusión al uso de organismos vivos o sus metabolitos, con el fin de eliminar o disminuir los daños causados por organismos perjudiciales. (Baddii et al, 2000)

1.2.2.2. Control biológico de Hormigas

En la actualidad, las hormigas han sido catalogadas como insectos plaga de importancia agrícola, pese a sus beneficios ambientales, ciertas especies de hormigas, como la hormiga Arriera, representan una amenaza para las plantaciones agrícolas, por lo que, ha sido necesario tomar medidas específicas. Sin embargo, la aplicación de controles químicos ha ocasionado un impacto negativo en el ambiente. (Guillade, A. C., 2017)

Con el fin de recuperar el equilibrio ecológico, y conseguir la conservación de los recursos naturales, se han desarrollado una serie de estrategias para controlar la sobrepoblación de hormigas en cultivos; estrategias que se basan en la aplicación de controles alternativos al uso de productos sintéticos, como los controles biológicos. (Badii & Abreu, 2006)

Para el control biológico de hormigas plaga, se están utilizando hongos que presentan una actividad entomopatógena como los hongos de las especies *Beauveria* y *Metarhizium* y también micoparásitos como el *Trichoderma*, los cuales vienen en una presentación en forma de polvo para aplicarlo de forma líquida, con una máquina insufladora o en mezcla como cebo para lo cual se puede utilizar, entre otros, jugo de naranja natural o artificial y salvado de maíz. (Lopez et al., 2001)



Figura1-1: Hongos entomopatógenos sobre hormiga
Fuente: INTA, 2014.

Beneficios de la aplicación del control biológico por hongos sobre hormigas

Según Cabrera et al. (2016) los beneficios que se presentan al usar el control biológico por hongos sobre hormigas son los siguientes.

- ✓ Retirada de los huecos de entrada.
- ✓ Descenso de la actividad externa y de la cantidad.
- ✓ Abertura de distintos huecos al original.
- ✓ En base al tamaño del hormiguero y la eficacia del tratamiento, puede reducirse en población, inactivarse un tiempo o morir.

1.2.3. Insecticidas naturales

Los insecticidas naturales pueden ser de origen biológico, botánico o mineral. El objetivo común de los tres es matar o de otra manera interferir con el comportamiento perjudicial de las plagas de insectos. Debido a que este objetivo se corresponde con la definición legal de un pesticida, todos los productos insecticidas naturales deben cumplir con las regulaciones federales y estatales para el registro, venta, transporte, uso, almacenamiento y eliminación. (Lacey et al., 2001)

Actividad Insecticida

Aun siendo su formulación proveniente de productos biológicos, de igual forma pertenece al grupo de biocidas, es decir que son empleados para matar, contrarrestar, impedir la acción o ejercer control sobre organismos vivos o detener su desarrollo (Directiva 98/8/CE, 1998). Es decir que su efecto puede llevar a la muerte de los insectos, mediante la inhibición de sus enzimas vitales.

1.2.3.1. Insecticidas de origen biológico

Se entiende que un insecticida biológico es aquel que proviene o se extrae mediante procedimientos que no cambian la composición química de un ser vivo, usando sustancias concentradas o diluidas, a las cuales se les puede o no adicionar los coadyuvantes necesarios, tomando en cuenta que la sustancia activa no proviene de ningún otro tipo que no sea el biológico. (De Liñán, 2015).

La ventaja de utilizar productos biológicos es que son menos propensos a tener un impacto negativo en organismos no diana, incluidas las personas (Lacey et al., 2001). Los organismos comúnmente usados para el desarrollo de insecticidas biológicos abarcan agentes bacterianos, agentes virales, agentes fúngicos, nematodos, insecticidas de ADN y especies de protozoos. (Murray et al., 2013)

Agentes fúngicos

Hoy en día, los hongos no se utilizan a menudo como insecticidas, en comparación al constante uso de otros pesticidas químicos, debido al hecho de que los agentes fúngicos presentan una acción relativamente lenta. Sin embargo, sus efectos adversos sobre el ambiente son escasos y su adquisición presenta una ventaja económica a diferencia de algunos insecticidas químicos. Aproximadamente 750 especies de hongos son patógenos para los insectos. Generalmente, aquellos hongos utilizados como insecticida incluyen: *Beauveria bassiana*, *Vericillium lecanii*, *Nomuraea rileyi*, *Lagenidium giganteum*, *Metarhizium anisopliae* y *Hirsutella thompsonii*. (Murray, T., et al., 2013)

1.2.3.2. Insecticidas de origen botánico

Se relacionan con la extracción de compuestos de las plantas para utilizarlos como insecticidas botánicos. Los insecticidas botánicos se obtienen generalmente por maceración (remojo y separación) de tejidos de plantas con alto contenido de ingredientes activos, y por destilación (evaporación y condensación) de compuestos activos específicos.

Estos insecticidas pueden considerarse productos aprobados orgánicamente, dependiendo del método de extracción y formulación. La ventaja de utilizar insecticidas botánicos, es su corta persistencia en el ambiente debido a una degradación rápida. Sin embargo, esta corta persistencia también puede considerarse una desventaja ya que pueden ser necesarias múltiples aplicaciones para lograr la supresión adecuada de plagas. (Murray, T., et al., 2013)

1.2.3.3. Insecticidas de origen mineral

Los insecticidas desarrollados a partir de fuentes elementales (minerales) extraídos de la tierra se clasifican como productos naturales y, a menudo cuestan menos que los otros insecticidas procesados o cosechados. La toxicidad de los insecticidas a base de minerales depende de las propiedades químicas de los elementos minadas. Algunos insecticidas minerales tales como el azufre están registrados para su uso orgánico y tienen efectos tóxicos relativamente bajos en las personas y los organismos que no se consideran como objetivo. (Lacey et al., 2001)

En la Tabla 2-1 se muestran las principales diferencias entre el uso de insecticidas naturales y los insecticidas de origen natural.

Tabla 2-1: Cuadro comparativo entre insecticidas químicos vs insecticidas naturales.

INSECTICIDAS QUÍMICOS	INSECTICIDAS NATURALES
Baja especificidad: capacidad de causar la muerte de otras especies de insectos y animales.	Alta especificidad: no afectan a otras especies
Alta toxicidad para el entorno	Restauran la biodiversidad funcional dentro de los agroecosistemas
Alto costo comercial	Relativamente económicos
Bioacumulación: causan efectos adversos en el ambiente	Presentan bajo impacto ambiental
Generación de poblaciones de insectos resistentes	No presentan riesgo de desarrollar resistencia
Rechazo por parte de las los insectos diana después de un tiempo.	Utilización de cebos que logran disimular la presencia de los hongos y eludir la capacidad de las hormigas para divisar agentes tóxicos o nocivos para la colonia
Recuperación de la colonia semanas después de la aplicación, debido a la evaporación de los componentes químicos.	Regulación de la abundancia de organismos indeseables dentro del sistema a través de la depredación, el parasitismo y la competencia (mayor permanencia)
Representan un riesgo para la salud ambiental	Ambientalmente amigables: mantienen la biodiversidad en la agricultura

Fuente: Lopez, E. & Orduz, S., 2001; Cabrera, R., et al., 2016.

Realizado por: Tatiana Dávila, 2018.

1.2.4. Repelentes Naturales

Los repelentes naturales son aquellos provenientes de la naturaleza, cuyo fin es alejar a los insectos u otros animales, que causan problema a las actividades del ser humano. Como por ejemplo el sembrar plantas aromáticas repelentes tales como menta, sábila, romero, mejorana, poleo, ajeno, clavo, ruda, menta entre otras, que actúan como barreras naturales contra ciertas plagas. Un sinnúmero de plantas producen sustancias que repelen a otras plantas, hongos, bacterias, nematodos, virus e insectos, por esta razón figuran un control natural efectivo, evitando el uso extendido de sustancias de origen químico. (Quintero & Toledo, 2011)

Las infusiones de las plantas aromáticas, son una excelente alternativa como repelente. Tomando en cuenta que un repelente ideal es aquel que no cause mortalidad. (Hilje, 1996)

Los repelentes biológicos incluyen todas aquellas sustancias usadas para el control de plagas y organismos adversos, cuyo principio activo proviene de organismos vivos.

1.2.5. Cítricos

Son plantas pertenecientes al género *Citrus* de la familia de las Rutáceas. Dentro de las cuales se encuentran las naranjas (*Citrus Sinensis*), naranjas enanas (*Citrus margarita*), naranjas amargas (*Citrus aurantium*), naranjas chinas (*Citrus japonica*), mandarinas (*Citrus reticulada*), pomelos (*Citrus paradisi*), limones (*Citrus limon*), limas (*Citrus aurantifolia*), toronjas (*Citrus medica*). De ellos, el naranjo y el limonero son considerados de los frutales más importantes en el mundo, su siembra y consumo es extendido por igual en todos los continentes (Morin, 1980).

1.2.5.1. Naranja

Citrus sinensis es una fruta subtropical que no soporta climas fríos, para su correcta maduración necesitan de un clima cálido. Requiere abiertamente de la luz para los procesos de floración y fructificación. Los naranjos se desarrollan en suelos arenosos o franco arenosos y no tolera la salinidad. La cosecha se cultiva principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo en más de 137 países en seis continentes, es ampliamente consumido tanto como fruta fresca o jugo debido a su alto contenido en vitamina C y potencial antioxidante (EARTH, 2004).

Composición de la cáscara de naranja

La cáscara de la naranja está dividida en dos capas, las cuales constituyen el exocarpo. Una parte externa pigmentada y compacta, llamada Flavedo y otra interna la cual es blanca y de aspecto esponjoso llamada Albedo. (León, 2000).

El albedo contiene sacos de aceite y pigmentos, mientras que el flavedo se compone de tejido vascular. Las células de Albedo son verdes, amarillas o anaranjadas, con bolsas de aceite. (Ye et al. 2017)

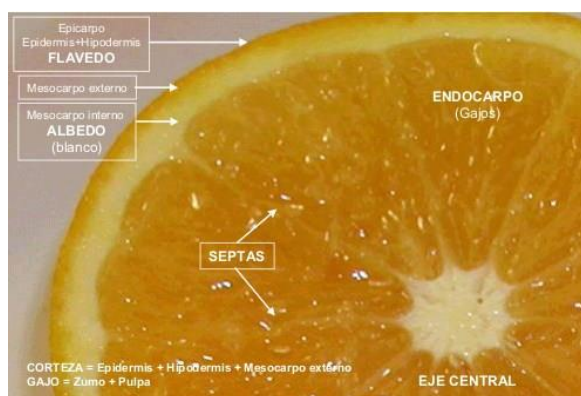


Figura 2-1: Partes de la cáscara de la naranja
Fuente: Naranjas Valencia, 2013

Los aceites esenciales se encuentran localizados en células especiales de la corteza. En las naranjas predomina el D-limoneno. La proporción en que se encuentran los diferentes terpenos es la que da el aroma característico a la fruta.

Beneficios ambientales

Según numerosos estudios la cáscara de naranja ha sido utilizada para la extracción de aceites esenciales y como adsorbente de metales pesados. (Oboh, et al., 2017).

Los aceites esenciales, también llamados aceites volátiles o etéreos, son líquidos aceitosos aromáticos caracterizados por un fuerte olor y producidos por diferentes materiales (flores, brotes, semillas, hojas, ramitas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces de las plantas) como metabolitos secundarios. Son mezclas naturales muy complejas de sustancias lipófilas, que pueden contener aproximadamente 20-60 componentes a diferentes concentraciones.

Se caracterizan por dos o tres componentes principales (limoneno, p-cimeno y ocimeno) en concentraciones relativamente altas (20-70%) en comparación con otros componentes presentes en cantidades traza. (Palazzolo et al., 2013)

En la naturaleza, las OE desempeñan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también contra los herbívoros mediante la reducción de su apetito por este tipo de plantas. También pueden atraer a algunos insectos para favorecer la dispersión de polen y semillas, o repeler otros indeseables. Debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, sino que también se utilizan como alternativas a los productos químicos sintéticos para proteger el equilibrio ecológico sin mostrar los mismos efectos secundarios. (Oboh, G. et al., 2017)

La actividad biológica de las OE depende de su composición. Los componentes principales de las OE con propiedades antibacterianas son acetato de geranilo, acetato de eugenilo, mentol, carvacrol, timol, geraniol, eugenol, p-cimeno, limoneno, -terpineno, carvona. Los componentes fenólicos son principalmente responsables de las propiedades antibacterianas de las OE. Una característica importante de las OE parece ser su estabilidad de la composición, aunque se sabe poco acerca de los cambios en la composición durante el almacenamiento. (Caccioni, D. R., et al., 1998)

1.2.6. Hongos fitopatógenos

Según Gonzales (1976, p.16) dos tercios de las enfermedades de las plantas son causadas por hongos. La mayoría de especies son saprófitos obligados, pero cerca del 8% de las especies conocidas de hongos son fitoparásitos.

Los hongos fitopatógenos poseen una amplia gama de enzimas que destruyen los polímeros de carbohidratos, que constituyen los materiales de construcción de las paredes celulares. Primero, el parásito, al utilizar estas enzimas, penetra en la célula y se alimenta de sus nutrientes. En segundo lugar, en algunos parásitos necrotróficos estas enzimas son tan activas que degradan una parte más grande de la pared celular; con este marco fuerte eliminado, los procesos osmóticos destruyen el protoplasto, y la célula muere y pierde las propiedades inmunológicas de un ser vivo. En tercer lugar, los parásitos destruyen el tabique (cemento intercelular que pega células), lo que les permite avanzar más en los tejidos vegetales infectados.

Y cuarto, los parásitos se alimentan de los productos de degradación de polímeros de la pared celular, monosugars. (Dyacov, 2007)

En la Tabla 3-1 se aprecian las principales partes de los hongos fitopatógenos con sus respectivas funciones.

Tabla 3-1: Partes típicas de un Hongo Fitopatógeno.

PARTE	DESCRIPCIÓN	FUNCIÓN
Hifa	Estructuras tubulares largas, poseen paredes celulares rígidas que pueden ser reforzadas por paredes transversales perforadas llamadas tabiques (singular: tabique).	Absorben los nutrientes del medio ambiente y los transportan a otras partes del talo (cuerpo de los hongos). Finalmente, pueden unirse o modificarse para formar estructuras más complejas. La gran mayoría de los hongos producen hifas y solo un número mucho más pequeño, las levaduras viven sin él.
Micelio	Masa de filamentos tubulares ramificados, es decir de las hifas. Constituye el talo, o cuerpo indiferenciado, de un hongo típico	
Haustorio	Apéndice o proyección especializada de la Hifa.	Extraen nutrimentos del hospedante.
Esclerocio	Cuerpo Vegetativo macroscópico.	Medio de sobrevivencia en condiciones adversas.
Estroma	Aglomeración compacta de hifas.	En su superficie o en cavidades especiales, forma fructificaciones del hongo.
Rizomorfo	Estructura filiforme o en forma de cuerda, formada por hifas paralelas.	Condiciones adversas
Espora	Cuerpo formado por una o varias células.	Bajo condiciones favorables puede separarse del micelio y producir uno nuevo. Sirve como medio de reproducción.
Conidio	Espora asexual que por lo general no es resistente	
Clamidospora	Espora asexual, de pared gruesa por lo general resistente. Se puede formar en una hifa o un conidio.	Adaptada para la resistencia a condiciones adversas.
Esporangio	Órgano que produce esporas asexuales endógenas	

Fuente: Gonzales, 1976.

Realizado por: Tatiana Dávila, 2018.

La mayoría de los hongos fitopatógenos no poseen características especiales, el micelio se llega a extender dentro de los tejidos del hospedante, por lo que no es visible a simple vista.

1.2.6.1. Hongos en la cáscara de la naranja

Los cultivos de naranja normalmente, suelen perder su firmeza natural y tomar coloraciones verdosas o azuladas debido a la acción de microorganismos que invaden su superficie, específicamente diferentes especies de hongos que provocan su deterioro. Algunos afectan la fruta mientras aún están en el árbol. Otras causan que las naranjas se echen a perder mientras están almacenadas.

Penicillium

Las lesiones en los cítricos causadas durante la cosecha, proporcionan entradas a patógenos de heridas, incluyendo *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, agentes causales de moho verde y azul respectivamente. Ambos hongos son patógenos de herida estrictos que afectan a todas las especies de cítricos y cultivo, pueden infectar a la fruta en el campo, la planta de empaque y durante la distribución y comercialización. (Palou, Lluís, 2014).

El hongo invade la fruta mucho más rápidamente y predomina en las infecciones mixtas, causando aproximadamente un 60-80% de deterioro (Skaria et al., 2003). A medida que van creciendo, forman "filamentos". Su reproducción se realiza por conidiosporas; las cuales se asemejan a partículas de polvo que se desarrollan en nuevos hongos al momento de aterrizar sobre una naranja o en otra superficie con condiciones adecuadas. (Plaza et al., 2004)

Penicillium digitatum

Las colonias de *Penicillium digitatum* son planas y crecen rápidamente en agar de extracto de malta (MEA) y agar papa dextros (PDA). El anverso de la colonia es verde oliva y el reverso incoloro a amarillo crema o marrón pálido. La textura de la colonia es vellosa sin gotitas de exudado. El hongo puede germinar en medios artificiales a 5 °C y, en algunos casos, puede producir colonias de hasta 3 mm de diámetro. No hay crecimiento a 37 °C.

El olor puede ser fuerte, ya que se han detectado metabolitos volátiles como limoneno, valenceno, etileno, alcohol etílico, acetato de etilo o acetato de metilo. (Palou, Lluís., 2014).

El hongo *Penicillium digitatum* es la primera especie fitopatógena de *Penicillium* cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (Marcet-Houben et al., 2012), gracias al esfuerzo de colaboración de los equipos de investigación de Cataluña y Valencia. Secuenciaron dos cepas de *P. digitatum* que difieren en su resistencia a los fungicidas químicos comunes aplicados después de la cosecha para el control del moho verde y se encontró que pocas mutaciones eran responsables de tales diferencias. El análisis también fue indicativo de la reproducción sexual heterotólica y reveló las bases moleculares para la incapacidad de *P. digitatum* para asimilar el nitrato o producir los metabolitos patulina y penicilina. (JI Pitt, 2006)

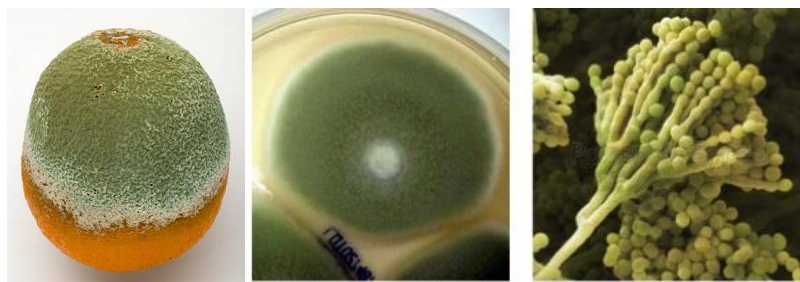


Figura 3-1: *Penicillium digitatum* en naranja, en cultivo y bajo el microscopio
Fuente: FOMESA FRUITECH

Penicillium italicum

A 25 °C, las colonias crecen de forma restringida en agar Czapek, pero más rápidamente en MEA y PDA. Las colonias son planas, de color oscuro, de color azul o gris-verdoso y, a menudo, aparecen granulares debido a la presencia de haces de conidióforos y cabezas de conidios. El reverso es incoloro o gris a marrón amarillento, aunque puede volverse de color marrón anaranjado o marrón rojizo en medios como el extracto de levadura Dox + de Czapek (CYA) o el extracto de levadura sacarosa (SÍ). La textura es vellosa a fasciculada, crustosa, con exudados ausentes o muy limitados. En CYA, los diámetros de colonias después de 7 días de incubación a temperaturas de 5, 15, 30 y 37 ° C son 2-4, 17-34, 0-12 y 0 mm, respectivamente. (Palou, Lluís, 2014).

El olor es causado por metabolitos volátiles como acetato de etilo, isopentanol, linalol, isobutanol, 1-octeno, butanoato de etilo, 1-noneno, estireno o citronelileno.

El aparato conidial consiste en penicillios asimétricos que llevan cadenas enmarañadas de conidios. Los conidióforos se originan en el sustrato u ocasionalmente en hifas superficiales y son terverticilados, hialinos, usualmente con las ramas adpresas, con estípites de $100-250 \times 3.5-5.0 \mu\text{m}$ y metulas más o menos cilíndricas, de pared lisa, que contienen de tres a seis fialidas cada una. Las fialidas son delgadas, cilíndricas con cuellos cortos pero distintos. (Vázquez, Daniel, 2017)



Figura 4-1: *Penicillium italicum* en cítricos y bajo el microscopio
Fuente: FOMESA FRUITECH

Diplodia

Las esporas de *Diplodia natalensis* atacan al fruto cuando aún se encuentran en los árboles. Suelen infectar una naranja en la zona de unión del árbol con ésta, permaneciendo inactivo hasta el momento de la cosecha y posteriormente, produce el deterioro como tal comenzando en el tallo.



Figura 5-1: *Diplodia natalensis*
Fuente: FOMESA FRUITECH

Botrytis

Botrytis cinerea suele desarrollarse en diferentes tipos de frutas, entre las cuales se encuentra las naranjas. El ataque de éste hongo se centra en infectar en primer lugar ramas, frutos pequeños y pétalos a medida que las naranjas van creciendo.



Figura 6-1: *Botrytis cinerea* en cítricos
Fuente: FOMESA FRUITECH

Diaporthe

La especie *Diaporthe citri* provoca la aparición de manchas oscuras, enfermedad conocida como Melanosis. Ataca inicialmente en las hojas de árboles de frutas cítricas y luego, eventualmente, en las frutas. Este hongo suele infectar naranjas, pero tiene mayor inclinación por los pomelos, por lo que se lo conoce también con el nombre de *Phomopsis*. (Timmer, L. W., et al., 2004)



Figura 7- 1: *Diaporthe citri* en fruto y hojas
Fuente: FOMESA FRUITECH

Colletotrichum

Colletotrichum gloeosporioides es un hongo que ataca inicialmente las ramas del naranjo y, de manera eventual, infecta la fruta que va presentando marcas de tonos rojizos y verdes hasta tornarse gradualmente oscuros.



Figura 8-1: Colletotrichum gloeosporioides en cítricos.
Fuente: FOMESA FRUITECH

1.2.7. Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (EPF) se han convertido en una fuerza importante en la configuración del contexto más amplio de los insecticidas dentro de los esquemas de manejo de plagas de insectos contemporáneos. Son un grupo muy heterogéneo de patógenos de insectos. Se conocen cerca de 700 especies pertenecientes a aproximadamente 100 órdenes. La evidencia histórica indica que los hongos entomopatógenos fueron los primeros en ser reconocidos como microorganismos causantes de enfermedades en los insectos. (Khachatourians & Qazi, 2008)

Los hongos entomopatógenos pueden atacar insectos de diferentes órdenes: lepidópteros, coleópteros, hemípteros, dípteros, ortópteros, himenópteros y artrópodos que no son insectos. Pero mientras algunas especies de hongos (que pertenecen principalmente a los *Hypocreales*) tienen un espectro muy amplio de víctimas potenciales, otros (principalmente *Entomophthorales*) son patógenos solo una especie particular de insecto. (Augustyniuk-Kram & Kram, 2012)

Los hongos entomopatógenos son agentes de control biológico eficaces y ambientalmente seguros que se pueden usar contra muchas especies de plagas importantes tanto en la agricultura como en la silvicultura porque son seguros para los animales, las plantas y el ambiente. Estos hongos se diferencian de otros insectos patógenos ya que pueden infectar a través del integumento del huésped, por lo tanto, la ingestión es innecesaria y la infección no se limita a los insectos masticadores. Por lo tanto, son únicos para controlar las plagas de insectos que se alimentan chupando plantas o fluidos animales. (Saranraj P., 2017)

1.2.8. Medios de cultivo y aislamiento

1.2.8.1. Agar Papa Dextrosa (PDA)

Agar Papa Dextrosa (PDA) es utilizado para el cultivo de hongos en laboratorio. PDA no está destinado para uso en el diagnóstico de la enfermedad u otras condiciones en los seres humanos. Es un medio de propósito general para levaduras y mohos que pueden ser suplementados con ácido o antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano. La base rica nutricionalmente (infusión de patata) alienta esporulación molde y la producción de pigmento en algunos dermatofitos. (Acumedia, 2017)

En la tabla 4-1 se detalla la fórmula aproximada por litro de agar papa dextrosa.

Tabla 4-1. Composición de Agar Papa Dextrosa (PDA)

Componente	Cantidad
Almidón de papa (de infusión)	4,0 g
Dextrosa	20,0 g
Agar	15,0 g

Fuente: United States Pharmacopeial Convention, Inc., 2008.

Realizado por: Tatiana Dávila, 2018.

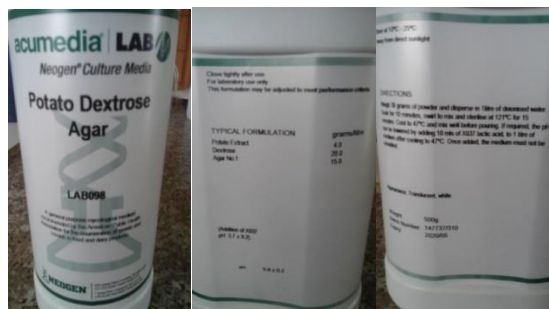


Figura 9-1: Agar Papa Dextrosa

Fuente: Tatiana Dávila, 2018.

1.2.8.2. Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)

Es un medio selectivo utilizado principalmente para el aislamiento de dermatofitos, otros hongos y levaduras pero también puede desarrollar bacterias filamentosas como Nocardia. El pH ácido de este medio (pH de aproximadamente 5,0) inhibe el crecimiento de bacterias, pero permite el crecimiento de levaduras y la mayoría de los hongos filamentosos.

Los agentes antibacterianos también se pueden agregar para aumentar el efecto antibacteriano. (Mac Faddin, J. F., 1985.)

Se pueden agregar antibióticos como cloranfenicol, gentamicina y tetraciclina como agentes selectivos para inhibir el sobrecrecimiento bacteriano de microorganismos competidores, al tiempo que permite el aislamiento exitoso de hongos y levaduras. También se informan otras modificaciones mediante el uso de cicloheximida, penicilina, estreptomina, neomicina dependiendo del uso previsto. (Wehr & Frank, 2004)

Principio: Los medios SDA se componen de digestión enzimática de caseína y tejidos animales que proporcionan una fuente nutritiva de aminoácidos y compuestos nitrogenados para el crecimiento de hongos y levaduras. (Isenberg & Garcia, 2004)

La dextrosa es el hidrato de carbono fermentable incorporado en altas concentraciones como fuente de carbono y energía. Agar es el agente solidificante. La adición de antibióticos como cloranfenicol y / o tetraciclina actúa como antimicrobianos de amplio espectro para inhibir el crecimiento de una amplia gama de bacterias gram-positivas y gram-negativas. La gentamicina se agrega para inhibir aún más el crecimiento de bacterias gramnegativas. (Isenberg & Garcia, 2004)

En la Tabla 5-1 se detalla la Fórmula aproximada por litro de Agar dextrosa Sabouraud.

Tabla 5-1: Composición de Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)

COMPONENTE	CANTIDAD
Peptona micológica (digestión enzimática de caseína y tejidos animales)	10,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agar	15,0 g
El pH se ajusta a 5.6 a 25 °C	

Fuente: NISHA RIJAL, 2015.

Realizado por: Tatiana Dávila, 2018.



Figura 10-1: Agar Dextrosa Sabouraud

Fuente: Tatiana Dávila, 2018.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Hipótesis y especificación de variables

2.1.1. Hipótesis

Los hongos presentes en las cáscaras de las naranjas de la finca orgánica del Chontal tienen efecto insecticida y/o repelente sobre las hormigas.

2.1.2. Variables

2.1.2.1. Variables Dependientes

Actividad insecticida o repelente (*% de Muertes; % de Repelencia*)

2.1.2.2. Variables Independientes

- Soluciones
 - Solución acuosa de cáscara de naranjas infectadas por hongos.
 - Solución acuosa de cáscara de naranja sanas.
 - Solución del hongo aislado a partir de las cáscaras de naranjas infectadas.

2.2. Tipo y Diseño de la investigación

La presente investigación es de tipo explicativa-experimental, debido a que realizó diferentes unidades experimentales con el fin de fundamentar las prácticas ancestrales referentes a la elaboración del insecticida orgánico en la zona del país anteriormente descrita.

Según la tendencia la presente investigación es de tipo cuantitativa por los datos obtenidos y comparados; por la secuencia de estudio es de tipo longitudinal ya que se han hecho varias observaciones a lo largo de la investigación en el laboratorio y campo.

2.2.1. Diseño Experimental

Se realizó el diseño experimental de tipo unifactorial.

Soluciones:

- Solución acuosa de cascara de naranja infectadas por hongos = Th
- Solución acuosa de cáscara de naranja sanas = Tn
- Solución del hongo aislado a partir de las cáscaras de naranjas infectadas = Ta
- Tratamiento de Control positivo= Tc
- Tratamiento Blanco = Tb

Concentración

- Al 100% = A
- Al 50% = B
- Al 25% = C

En la Tabla 1-2 se muestra las unidades experimentales del diseño factorial.

Tabla 1-2: Diseño Experimental

SOLUCIONES	CONCENTRACIÓN	UNIDADES EXPERIMENTALES		
Th	A	ThA1	ThA2	ThA3
Th	B	ThB1	ThB2	ThB3
Th	C	ThC1	ThC2	ThC3
Tn	A	TnA1	TnA2	TnA3
Tn	B	TnB1	TnB2	TnB3
Tn	C	TnC1	TnC2	TnC3
Ta	A	TaA1	TaA2	TaA3
Ta	B	TaB1	TaB2	TaB3
Ta	C	TaC1	TaC2	TaC3
Tc*	A	TcA1	TcA2	TcA3
Tb*	A	TbA1	TbA2	TbA3

*Tratamientos de control

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

2.2.2. Unidad de Análisis

Residuos de naranja con y sin presencia de colonias de hongos en los cultivos de la finca orgánica del Chontal.

2.2.3. Población de Estudio

Residuos de naranjas provenientes de la finca orgánica del Chontal.

2.2.4. Tamaño de la muestra

Se usó 150 g de cáscaras de naranjas desinfectadas y 150 g de cáscaras de naranjas con esporas de hongos visibles, para preparar 2 L de cada solución. Cantidad necesaria para un total de 6 unidades experimentales.

2.2.5. Selección de la muestra

Los residuos de naranjas fueron seleccionadas al azar en el suelo alrededor de 3 árboles. Un total de 15 naranjas en mal estado, con presencia de colonias de hongos visibles y 15 naranjas en buen estado, sin la presencia de colonia hongos visibles.

2.3. Técnicas de Recolección de datos

2.3.1. Zona de Estudio

La presente investigación se realizó con muestras de residuos de naranjas provenientes de una finca orgánica del Chontal, comuna perteneciente a la parroquia García Moreno del cantón Cotacachi, en la provincia de Imbabura. Dicha comuna se encuentra al noroccidente de la provincia de Pichincha, a 60 km del noroeste de la capital y a 50 km al oeste de Cotacachi.

Su temperatura oscila entre los 17 y 22 °C, posee una humedad relativa del 80% y se encuentra a una altitud de 650msnm. Tiene un clima tropical-húmedo.

Los habitantes de esta comuna se dedican en su mayoría a la producción orgánica de especies como yuca, café, cacao, papa, zanahoria blanca; frutas tales como piña, pitahaya, naranja, plátano, guaba, mandarina, naranjilla, limón. Además a la crianza de tilapias, cerdos, gallinas, cuyes, conejos, ocas. Por lo que las familias con granjas son autosuficientes.

San Miguel del Chontal se encuentra dentro de las rutas de turismo comunitario del país, debido a que es rico en fauna y flora, así como paisajes de cascadas y bosques nativos. Es un lugar lleno de vegetación en la que predominan orquídeas y árboles madereros, es por ello que el turismo impulsado por sus habitantes lo hace un lugar acogedor.

En la finca orgánica del Chontal de la familia Mina, de igual forma se cultivan un sin número de productos, con los cuales comercializan con los sectores cercanos como García Moreno, Apuela y Santa Rosa. En la finca, las hormigas han venido siendo una plaga que disminuye su producción, por lo que las alternativas al uso de insecticidas químicos, les han ayudado a terminar con los problemas provocados por estos insectos.

2.3.2. Lugar de la investigación

La investigación se realizó en dos fases. La primera fase consistió en el trabajo dentro del laboratorio. Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, ubicada en la Panamericana Sur Km 1 $\frac{1}{2}$, del cantón Riobamba de la provincia de Chimborazo.

2.3.3. Recolección de la muestra

La recolección de las muestras se realizó partiendo de un muestreo aleatorio. Se tomaron 5 naranjas visiblemente con presencia de colonias de hongos en sus cortezas, a los alrededores del suelo de 3 naranjos. Siguiendo el mismo método se tomaron 5 naranjas sanas, que no presentaban signo de infección por hongos en sus cortezas. Se tomó un total de 30 muestras de naranjas.

2.3.4. Primera etapa- Fase de laboratorio

La primera etapa consistió en el aislamiento de los hongos representativos de la “pudrición verde” de la cáscara de naranja y la preparación de las soluciones usadas para las pruebas *in vivo*.

2.3.4.1. Caracterización microbiológica

Preparación de Medios de Cultivo

Se prepararon dos medios de cultivo selectivos para hongos Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) + Cloranfenicol.

Para preparar el medio de cultivo PDA, se hace la relación de 39 g por litro de agua destilada. El medio SDA + Cloranfenicol ya es un medio selectivo, por lo que solamente se prepara en relación de 65 g de polvo por cada litro de agua destilada. Se realizan los cálculos para el número de cajas Petri necesarias. Siguiendo las especificaciones del fabricante, se llevan ambos medios a autoclavar.

Para que el PDA sea un medio selectivo para hongos, es decir que inhiba el crecimiento de bacterias, se preparó una solución antibiótica de cloranfenicol, en la que se pesa 0,05 g de Cloranfenicol y se añade 10 mL de alcohol al 90 – 95%. Una vez preparado el medio según las especificaciones y cantidad necesaria, se añade la solución antibiótica a una relación de 10 mL por 0,5 L de medio de cultivo. (Gómez et al. 2014)

Tabla 2-2: Preparación de solución stock de Cloranfenicol

COMPOSICIÓN		PREPARACIÓN
Cloranfenicol en polvo	0,05 g	Pesar 0,05 g de cloranfenicol en un frasco estéril, con la ayuda de una pipeta estéril añadir 10 mL de alcohol al 95%. Refrigerar si su uso no es inmediato.
Alcohol etílico al 95%	10 mL	

Fuente: Gómez et al. 2014 p. 28

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Preparación de diluciones seriadas a partir de residuos de naranjas

Las diluciones seriadas se prepararon a partir de una solución de cáscaras de naranjas con esporas de hongos visibles. Se pesó 50 g de las cáscaras de naranja y se agregó 450 mL solución salina estéril al 0,9%.

Se colocaron 8 tubos con 9 mL de la solución salina y se realizaron las diluciones, tomando 1 mL de la dilución madre hasta llegar a la dilución 10^{-8} .

Siembra en Superficie

Siguiendo la técnica de siembra en superficie se tomó 0,1mL de cada dilución y se colocó en el centro de la placa, se realiza un estriado por toda la superficie del agar, con el fin de que la alícuota sea distribuida por toda la placa. Este proceso se realizó tanto en el agar PDA como SDA por duplicado. Tomando en cuenta la investigación realizada por Ochoa et al (2007) las cajas se incubaron por 7 días a una temperatura de 30°C.

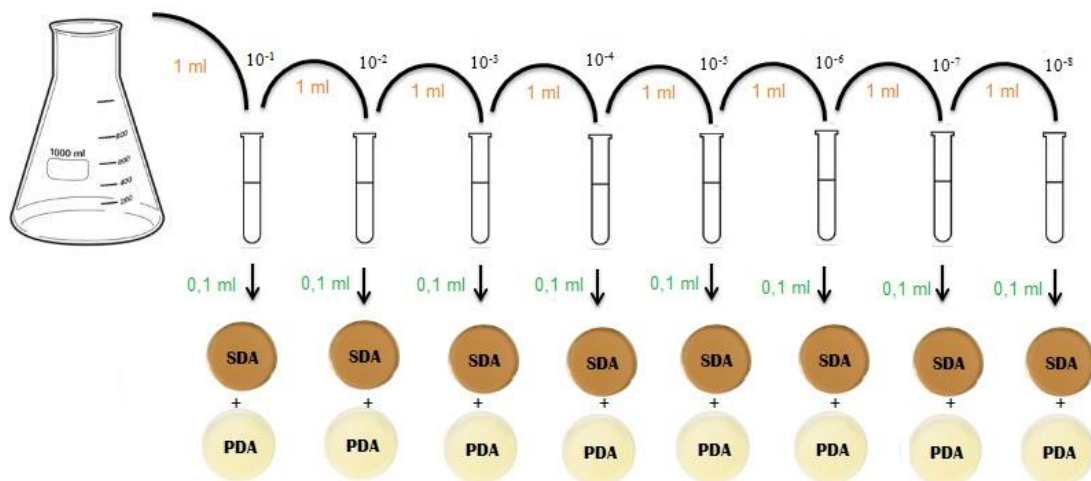


Figura 11-2: Esquema de las diluciones en serie y siembra en superficie.
Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Siembra de Hongos Fitopatógenos

Con el fin de obtener un crecimiento de hongos característicos de la pudrición verde de la naranja, adicionalmente se siguió el método de siembra de hongos fitopatógenos a partir de tejido vegetal infectado (Ownley y Trigiano, 2016), el cual consiste en cortar porciones de 4 mm x 4 mm y 1mm de profundidad aproximadamente, de la corteza de la fruta. A los cortes se los pasa por un proceso de desinfección superficial descrito en la Tabla 3-2. Una vez desinfectadas, las porciones cortadas se colocan en las superficies del agar. Se situaron dos cortes en una caja y un corte en otra caja en cada agar PDA y SDA respectivamente, por duplicado. Se incubaron por 7 días a 30°C.

Tabla 3-2: Desinfección de las cortezas

SOLUCIONES	PROCEDIMIENTO
Alcohol al 70%	Se colocan las porciones en una gasa estéril y se sumerge en alcohol al 70%, seguido de un lavado en agua destilada estéril por tres ocasiones, se los sumerge en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y nuevamente son lavados por tres ocasiones en el agua destilada estéril. Se retira el exceso de agua colocándoles sobre papel absorbente.
Hipoclorito de sodio al 1%	
Agua destilada estéril	

Fuente: Gómez et al. 2014, p 13.

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Aislamiento de hongos de la cáscara de naranja

Trascurrido el tiempo de incubación y tras observaciones a los 3 y 5 días, se seleccionaron los crecimientos de hongos representativos de las cajas, realizando un corte de la porción de agar y colocando en una nueva caja con el agar correspondiente. Se los incubó por 7 días a 30°C.

Identificación macroscópica y microscópica

Para la identificación macroscópica se observó las características de crecimiento y color, posteriormente se realizó una identificación microscópica de las esporas mediante una tinción con azul de lactofenol. (Silva et al, 2007)

2.3.4.2. Preparación de Soluciones

Soluciones acuosas a partir de las cáscaras de naranja

Para la preparación de soluciones se partió de la técnica artesanal usada en la finca orgánica del Chontal, se tomó en cuenta que en la finca se prepara un extracto de cáscara de naranja, con las cortezas hasta que el agua las cubra por completo. Se realizaron análisis previos siguiendo esta metodología, determinándose una proporción de gramos de cáscara de naranjas por mililitros de agua.

Tras las pruebas preliminares, se determinó preparar una solución madre por cada factor. En una proporción de 2 L de agua destilada en 150 g de cáscaras de naranjas. A partir de esta solución se preparó 3 diluciones de 1 litro, a diferente concentración.

Tabla 4-2: Preparación de soluciones a partir de cáscaras de naranjas

MUESTRA	PROPORCIÓN PESO : VOLUMEN	PREPARACIÓN
Cáscara de naranja sin presencia de hongos	150 g : 2000 mL	Se prepara una solución madre, agregando 2 L de agua a 150 g de cáscaras de naranjas y se dejó reposar por 24 horas. De esta solución se tomó 1000 mL, 500 mL y 250 mL, y se diluyó en 1L de agua destilada, para formar 2 soluciones para las pruebas experimentales <i>in vivo</i> .
Cáscara de naranja con presencia de esporas hongos	150 g : 2000 mL	

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Solución acuosa a partir del aislamiento

Para la solución preparada a partir de las cepas de hongos puros aislados de la cáscara de naranja infectada, se realiza como primer paso la preparación de un medio líquido descrito por Gómez et al. (2014). La masificación se realizó en medio líquido Papa Dextrosa (PD).

Tabla 5-2: Preparación de medio líquido Papa Dextrosa

COMPOSICIÓN		PREPARACIÓN
Papa	250 g	Cortar las papas en cubos y lavarlas. Agregar a 800 mL de agua destilado hirviendo. Extraer el sobrenadante y filtrar. Enzazar a 1 litro completando con agua destilada. Agregar la dextrosa. Agitar, y distribuir 650 mL en un erlenmeyer. Esterilizar. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
Dextrosa	18 g	
Agua destilada	1000 mL	

Fuente: Gómez et al. 2014 p. 29

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Al medio frío se le agregó 0,1g de Cloranfenicol. Tras ensayos preliminares se determinó colocar 1 cuarto de caja con el hongo aislado en 250 mL del medio PD. Se dejó incubar por 5 días y se obtuvo la solución de esporas por agitación.

Se preparó una solución madre de 2 L de con una media de 1×10^6 esporas/mL (Monzón 2001). Para llegar a esta relación, se realizó un conteo del número de esporas.

Conteo de esporas

Para determinar la concentración de esporas necesarias se usó la cámara Neubauer, la cual permite realizar conteos de esporas en campos de dimensiones conocidas (Cuervo et al. 2002, p85). Se utilizó el cuadrante central y se contaron los conidios ubicados en los 5 cuadrantes mostrados a continuación:

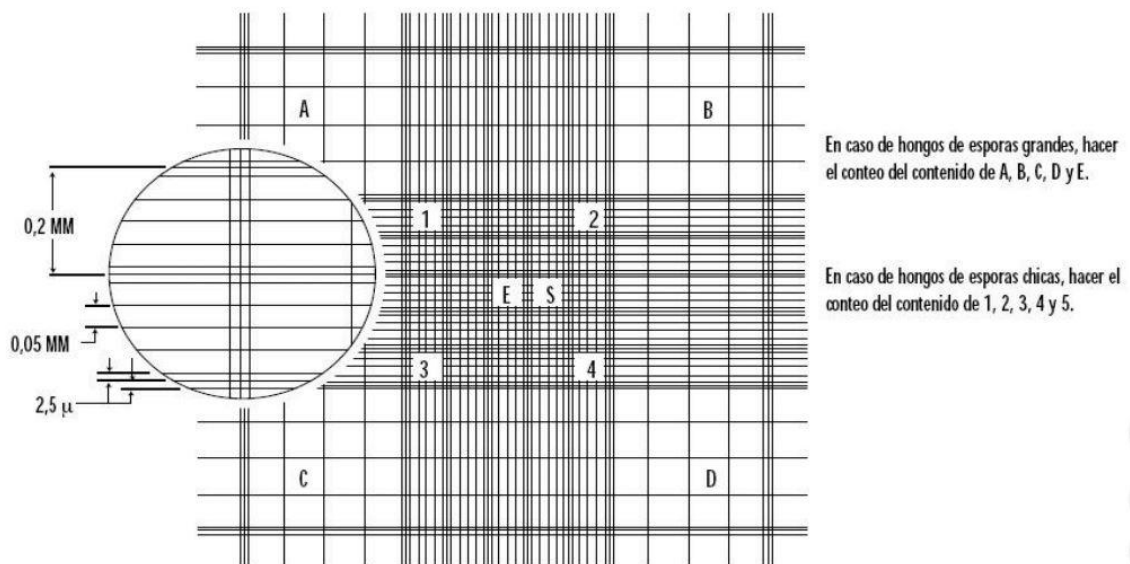


Figura 2-2: Cámara de Neubauer, campos de conteo

Fuente: (Cuervo et al. 2002, p85). Rayado del hematocímetro que muestra los campos de conteo A, B, C, D.

Se obtiene el número de esporas por mililitro de la suspensión inicial y por medio de diluciones se consigue el inóculo en la concentración deseada.

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = \frac{TCC \times Cc}{\text{numero de cuadrados}}$$

$$V_1 = \frac{V_2 \times C_2}{C_1}$$

Dónde:

TCC = Promedio total de esporas contabilizadas

Cc = Constante de la cámara (250000)

V₁ = Volumen inicial desconocido, alícuota necesaria para la dilución

C₁ = Concentración inicial, conocida en el conteo

V₂ = Volumen a preparar en la concentración deseada

C₂ = Concentración final deseada

Siguiendo el proceso de preparación de las diluciones a partir de las cáscaras de naranjas, se preparó una solución madre ajustando el número de esporas en 2 litros de agua destilada estéril y de esta se tomó 3 alícuotas para preparar 3 diluciones de 1 L cada una, al 100%, 50% y 25%, para los análisis estadísticos.

2.3.5. Segunda etapa – Fase de Campo

La segunda etapa consistió en la aplicación de las soluciones *in vivo*. Se seleccionaron 15 rutas una por cada solución y blancos.

2.3.5.1. Identificación de rutas a los hormigueros

En las pruebas preliminares, se determinó las horas adecuadas para realizar las pruebas *in vivo*. Se estableció la ubicación de hormigueros y las rutas de tránsito principal de las hormigas obreras. Siguiendo la metodología de identificación de ruta (Salas et al, 2015):

- a. Se identifican los hormigueros y las rutas principales de las hormigas obreras para la búsqueda de alimento.
- b. Se usa una codificación específica para las rutas de los hormigueros seleccionados.
- c. Se realiza un conteo por minuto de hormigas en un metro lineal en sus rutas a tres horas del día.

2.3.5.2. Aspersión de las soluciones in vivo

Una vez identificadas las 15 rutas, una por cada solución y blancos. Se asperjó las soluciones sobre un metro lineal de cada ruta seleccionada durante 1 minuto. Se esperó 15 minutos para observar los efectos causados. Este proceso se realizó a 3 horas en la mañana, por 3 días.

2.3.5.3. Observación directa de la acción de las soluciones sobre las hormigas

Se contó el número de hormigas que pasan por la ruta seleccionada durante 1 minuto, antes de ser aplicada la solución correspondiente. Se hizo un nuevo conteo después de 15 minutos de haber aplicado cada solución.

2.3.6. Análisis Estadístico

Se analizaron los porcentajes de repelencia y los porcentajes de muerte de las hormigas, de los datos obtenidos durante el tiempo de observación tras la aplicación de las soluciones y las respectivas concentraciones. Aplicando un análisis estadístico mediante el programa IBM SPSS Statistics 23, se realizó una comparación de medias, usando ANOVA de un factor.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS

3.1. Resultados, análisis y discusión

3.1.1. Primera Etapa – Fase de Laboratorio

3.1.1.1. Caracterización microbiológica

En las placas sembradas con la técnica de las diluciones seriadas, se encontró un elevado crecimiento de levaduras en las cajas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . En las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} , no hubo crecimiento microbiano.

Aun así en 3 de las cajas con dilución 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , se dio el crecimiento de un hongo con aspecto característico de la podredumbre verde en las cortezas de cítricos como la naranja. En adición, estos crecimientos solo se dieron en el agar Sabouraud.

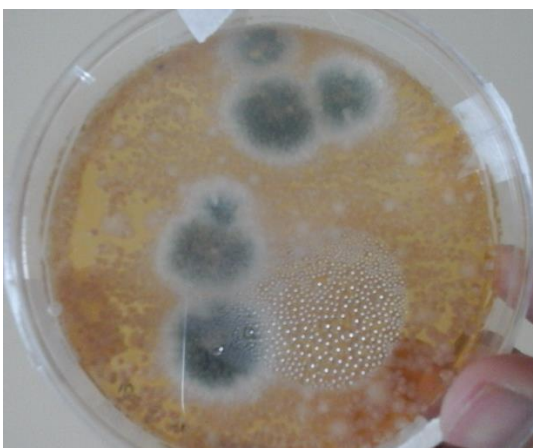


Figura 1-3: Crecimiento de la dilución 10^{-3} en Agar Sabouraud.
Fuente: Tatiana Dávila. 2018

En cuanto a la metodología del aislamiento de hongos fitopatógenos, se pudo observar un mejor crecimiento del hongo característico de las infecciones en la corteza de naranjas, no se produjo proliferación excesiva de levaduras.

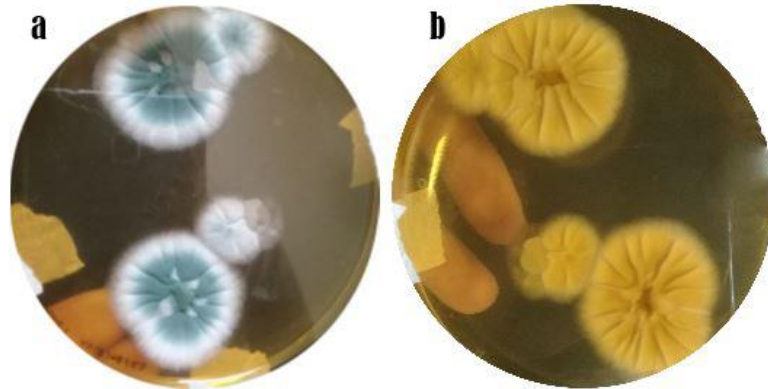


Figura 2-3: Crecimiento de hongos a partir de tejidos infectados.
a) Vista frontal de la caja y b) Reverso de la caja

Fuente: Tatiana Dávila. 2018

En la superficie de agar Sabouraud, después de una incubación de 7 días, se apreciaron colonias de color verde, la superficie granular, pliegues en distribución radial, con bordes de color blanco.

Tras la observación macroscópica se realizó una comparación con las cepas de hongos aisladas por Ochoa et al (2007) a partir de cortezas de naranjas, lo que indicó que el género de las cepas identificadas es *Penicillium*.

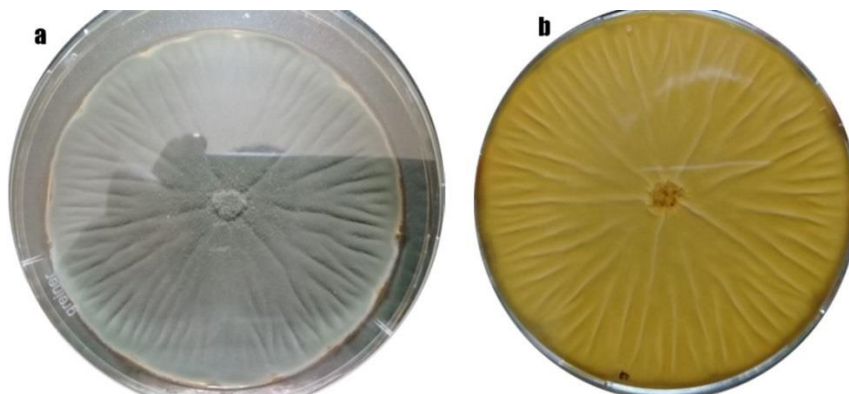


Figura 3-3: Aislamiento de *Penicillium* spp en agar Sabouraud.

a) Vista frontal de la caja y b) Reverso de la caja

Fuente: Tatiana Dávila. 2018

Se confirmó el género según sus características microscópicas como lo describe Tangarife (2011) en la recopilación de características de cultivos aislados de *Penicillium* spp, mismos que presentan conidios con estructura ramificada a manera de pincel.

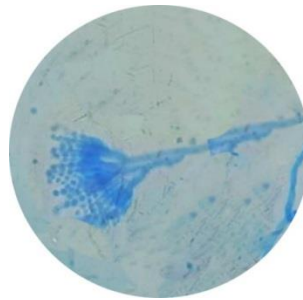


Figura 4-3: *Penicillium* spp visto al microscopio
Fuente: Tatiana Dávila. 2018

3.1.1.2. Preparación de las soluciones

Soluciones acuosas a partir de las cáscaras de naranjas

En la Tabla 1-3 se aprecian las concentraciones de las tres soluciones preparadas a partir de las soluciones madres, las cuales se colocaron en reposo a una temperatura de 20°C.

Tabla 1-3: Concentración de las soluciones preparadas a partir de cáscaras de naranjas

MUESTRA	DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN %V/V
Cáscara de naranja sin presencia de hongos	A	100
	B	50
	C	25
Cáscara de naranja con presencia de esporas hongos	A	100
	B	50
	C	25

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Solución acuosa a partir del aislamiento

El conteo de esporas permitió ajustar una dilución en agua destilada estéril de 2 L. En los 250 mL de medio líquido PD se obtuvo una media de $1,1 \times 10^7$, como lo muestra la Tabla 2-3.

Tabla 2-3: Conteo de esporas en el medio líquido PD

REPETICIONES	CONCENTRACIÓN (esporas/mL)
1	$1,1 \times 10^7$
2	$1,3 \times 10^7$
3	$9,9 \times 10^6$
Promedio	$1,1 \times 10^7$

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

$$V_1 = \frac{2000 \text{ mL} \times 1 \times 10^6 \text{ esporas/mL}}{1,1 \times 10^7 \text{ esporas/mL}} = 181 \text{ mL}$$

La solución madre de 2 L se preparó a partir de la concentración de $1,1 \times 10^7$ esporas/mL, tomando una alícuota de 181 mL para llegar a una media de 1×10^6 esporas/mL.

Tabla 3-3: Esporas en las soluciones a partir del aislamiento

SOLUCIONES %v/v	CONCENTRACIÓN (esporas/mL)
100%	1×10^6
50%	5×10^5
25%	$2,5 \times 10^5$

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

3.1.2. Segunda etapa – Fase de Campo

3.1.2.1. Identificación de las rutas a los hormigueros

Se seleccionaron 15 rutas diferentes hacia los hormigueros, una por cada concentración de las 3 soluciones sometidas a experimentación *in vivo* y 3 por cada solución control. Las horas adecuadas para colocar cada solución se establecieron a las 7:00, 8:00 y 9:00 de la mañana. Las medias de los porcentajes de repelencia y porcentaje de muertes en las horas establecidas se reporta en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3: Promedio del porcentaje de repelencia y muerte en las horas establecidas

Hora		Porcentaje de Repelencia	Porcentaje de Muertes
7:00am	Media	42,0498	14,9256
	Desviación estándar	33,63989	26,41797
8:00am	Media	43,9911	16,4631
	Desviación estándar	33,75107	30,09923
9:00am	Media	44,4522	17,1780
	Desviación estándar	37,57807	33,31147
Total	Media	43,4977	16,1889
	Desviación estándar	34,79078	29,86467

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

3.1.2.2. Aspersión de las soluciones *in vivo*

La acción de cada solución con su concentración respectiva se la evaluó en cada ruta. El promedio de porcentaje de repelencia por solución y concentración se muestra en la Tabla 5-3, en tanto el porcentaje de muerte por cada solución y concentración se detalla en la Tabla 6-3.

Tabla 5-3: Promedio del porcentaje de repelencia de las soluciones aplicadas a diferente concentración

Soluciones	Concentración	Media	Desviación estándar	N
Cáscara SIN hongo	Al_25%	44,7322	7,83979	9
	Al_50%	52,1911	8,33984	9
	Al_100%	65,6189	8,08005	9
	Total	54,1807	11,74570	27
Cáscara CON hongo	Al_25%	61,2711	8,55899	9
	Al_50%	65,6056	7,69176	9
	Al_100%	76,5067	7,87574	9
	Total	67,7944	10,12386	27
Aislamiento Hongo	Al_25%	7,0100	4,60689	9
	Al_50%	9,4056	6,16020	9
	Al_100%	9,9189	4,11625	9
	Total	8,7781	5,00888	27

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Tabla 6-3: Promedio del porcentaje de muertes de las soluciones aplicadas a diferente concentración

Soluciones	Concentración	Media	Desviación estándar	N
Cascara SIN hongo	Al_25%	2,8856	3,95343	9
	Al_50%	4,8044	4,34700	9
	Al_100%	3,0600	3,12831	9
	Total	3,5833	3,79658	27
Cascara CON hongo	Al_25%	5,5122	3,35457	9
	Al_50%	12,3244	7,62389	9
	Al_100%	7,1189	8,59607	9
	Total	8,3185	7,27062	27
Aislamiento Hongo	Al_25%	1,9700	3,10995	9
	Al_50%	,8544	2,56333	9
	Al_100%	1,6533	2,52420	9
	Total	1,4926	2,68085	27

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

3.1.2.3. Observación directa de la acción de las soluciones sobre las hormigas

De la observación directa del conteo de tránsito de hormigas antes y después de la aplicación, se obtuvieron 135 datos experimentales para el análisis estadístico. La Tabla 7-3 se muestra los estadísticos descriptivos del porcentaje de repelencia y porcentajes de muertes de las tres soluciones aplicadas in vivo y los controles positivo y negativo.

Tabla 7-3: Estadísticos descriptivos del porcentaje de repelencia y porcentaje de muerte frente a las soluciones aplicadas

	N	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo	
				Límite inferior	Límite superior			
% Repelencia	Cascara SIN hongo	27	54,1807	11,74570	49,5343	58,8272	28,57	77,27
	Cascara CON hongo	27	67,7944	10,12386	63,7896	71,7993	41,18	84,85
	Aislamiento Hongo	27	8,7781	5,00888	6,7967	10,7596	,00	17,86
	Control Positivo	27	85,1937	18,63473	77,8221	92,5654	33,33	100,00
	Control Negativo	27	1,5415	2,93146	,3818	2,7011	,00	9,52
	Total	135	43,4977	34,79078	37,5755	49,4199	,00	100,00
% Muertes	Cascara SIN hongo	27	3,5833	3,79658	2,0815	5,0852	,00	11,11
	Cascara CON hongo	27	8,3185	7,27062	5,4424	11,1947	,00	25,00
	Aislamiento Hongo	27	1,4926	2,68085	,4321	2,5531	,00	8,00
	Control Positivo	27	66,8822	33,84717	53,4927	80,2717	,00	100,00
	Control Negativo	27	,6678	2,04106	-,1396	1,4752	,00	8,33
	Total	135	16,1889	29,86467	11,1052	21,2726	,00	100,00

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

3.1.3. Análisis Estadístico

3.1.3.1. Porcentaje de Repelencia

Mediante un análisis estadístico usando ANOVA de un factor, se buscó conocer si existen diferencias entre las soluciones aplicadas y la concentración de las mismas con respecto al porcentaje de repelencia usando la prueba de Tukey.

Tabla 8-3: Pruebas de efectos inter-sujetos para porcentaje de Repelencia

Variable dependiente: Porcentaje de Repelencia					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	149206,463 ^a	10	14920,646	142,463	,000
Intersección	251978,334	1	251978,334	2405,906	,000
Soluciones	51566,864	2	25783,432	246,182	,000
Concentración	2341,888	2	1170,944	11,180	,000
Soluciones * Concentración	827,314	4	206,828	1,975	,102
Error	12986,923	124	104,733		
Total	417620,166	135			
Total corregido	162193,385	134			

a. R al cuadrado = ,920 (R al cuadrado ajustada = ,913)

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Planteamiento de la hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en el porcentaje de repelencia por efecto de las soluciones aplicadas. $p \geq 0,05$

H₁: Existen diferencias entre el porcentaje de repelencia por efecto de las soluciones aplicadas. Al menos una solución es diferente. $p \leq 0,05$

Decisión

Estadísticamente se rechaza la hipótesis nula debido a que a que el nivel de significancia $p=0,000$, siendo menor a $0,05$. Se acepta la hipótesis alternativa H₁, lo que significa que existen diferencias significativas entre las medias de los porcentajes de repelencia, por lo que al menos una de las soluciones aplicadas es diferente. Se justifica realizar pruebas Post-Hoc para encontrar subconjuntos homogéneos y realizar comparaciones

Tabla 9-3: Subconjuntos homogéneos del % de repelencia frente a las soluciones aplicadas

Soluciones	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Control Negativo	27	1,5415			
Aislamiento Hongo	27	8,7781			
Cascara SIN hongo	27		54,1807		
Cascara CON hongo	27			67,7944	
Control Positivo	27				85,1937
Sig.		,126	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 27,000.

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

El test HSD de Tukey permite comparar las medias de las soluciones aplicadas sobre las hormigas en el tiempo de experimentación *in vivo*. En la Tabla 9-3 se muestra homogeneidad solamente entre las medias obtenidas con el control negativo y la solución preparada a partir del hongo asilado. Las medias para las soluciones a partir de las cáscaras de naranjas con presencia de esporas de hongos y las cáscaras de naranjas sin presencia de esporas de hongos, muestran medias diferentes, incluso frente a la solución control. Lo que corrobora lo expuesto en la Tabla 8-3, que indica que las soluciones aplicadas tienen un efecto diferente entre si sobre las hormigas.

Para determinar cuál de las tres soluciones tiene un mayor porcentaje de repelencia se realiza un gráfico de barras. Las soluciones con su respectiva media de porcentaje de repelencia se pueden observar en el Gráfico 1-3. Determinando un 67,79% de repelencia para la solución preparada a partir de las cáscaras de naranjas con presencia de esporas de hongos, frente a un 79,50% para la sustancia de control positivo. Seguida de la solución preparada a partir de las cáscaras de naranja sin esporas de hongos con un 54,18%. Y por último la sustancia preparada a partir del aislamiento con un 8,79%, frente al control negativo con un 1,90%.

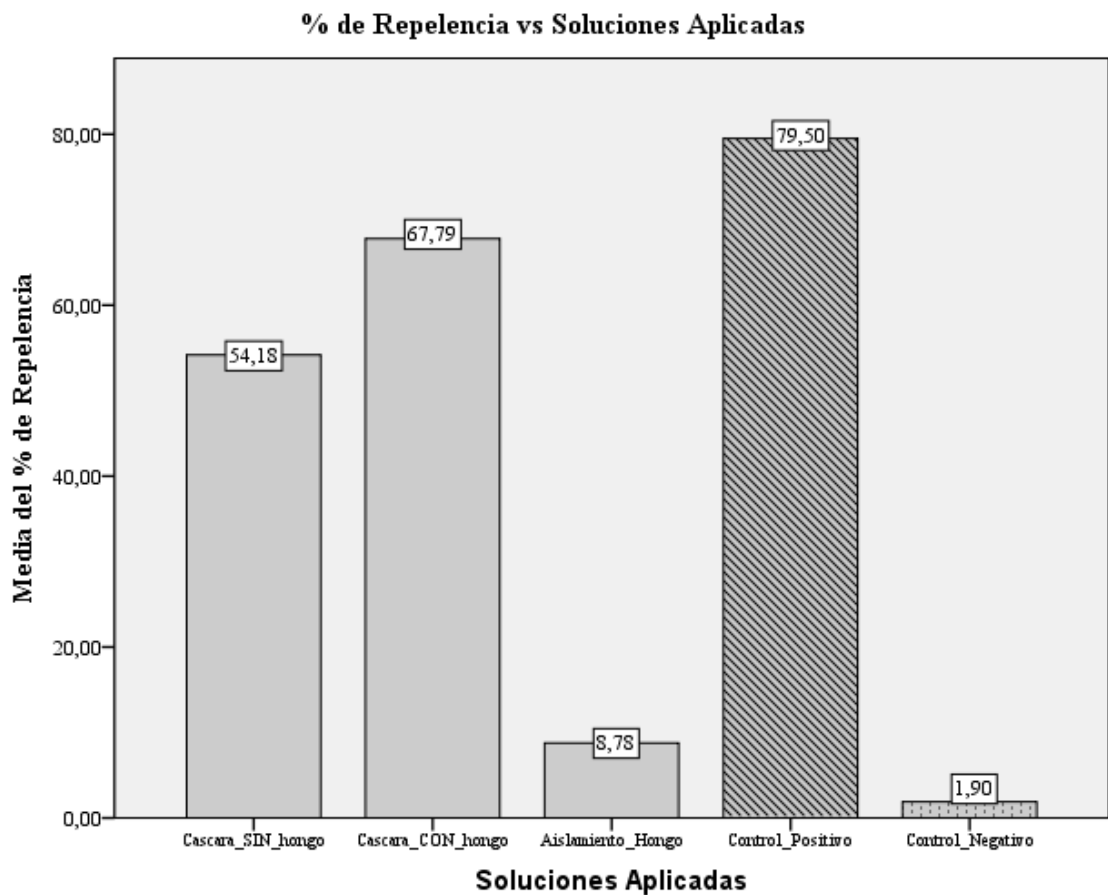


Gráfico 1-3: Porcentaje de Repelencia vs Soluciones Aplicadas
Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

3.1.3.2. Porcentaje de Muertes

Mediante un análisis estadístico se buscó conocer si existen diferencias entre las soluciones aplicadas y la concentración de las mismas con respecto al **porcentaje de muertes**.

Tabla 10-3: Pruebas de efectos inter-sujetos para Porcentaje de Muertes

Variable dependiente: Porcentaje de Muertes

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	87938,129 ^a	10	8793,813	34,533	,000
Intersección	27880,751	1	27880,751	109,488	,000
Soluciones	660,478	2	330,239	1,297	,277
Concentración	97,977	2	48,989	,192	,825
Soluciones * Concentración	156,495	4	39,124	,154	,961
Error	31576,279	124	254,647		
Total	154895,225	135			
Total corregido	119514,408	134			

a. R al cuadrado = ,736 (R al cuadrado ajustada = ,714)

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Planteamiento de la hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en el porcentaje de muertes por efecto de las soluciones aplicadas. $p \geq 0,05$

H₁: Existen diferencias entre el porcentaje de muertes por efecto de las soluciones aplicadas. Al menos una solución es diferente. $p \leq 0,05$

Decisión

Estadísticamente no existen argumentos para desechar la hipótesis nula, debido a que el nivel de significancia $p > 0,05$. No existe diferencia en el porcentaje de muertes con respecto a las soluciones aplicadas y las concentraciones de las mismas, es decir que todas tienen el mismo efecto.

La Gráfica 9-3 muestra que únicamente el control positivo presenta un alto porcentaje de muertes del 66,88%. Las tres soluciones experimentales (Cáscara sin hongo, cáscara con hongo y hongo aislado) y el control negativo poseen un porcentaje bajo muertes en las hormigas, del 3,58%, 8,32%, 1,49% y 0,67%.

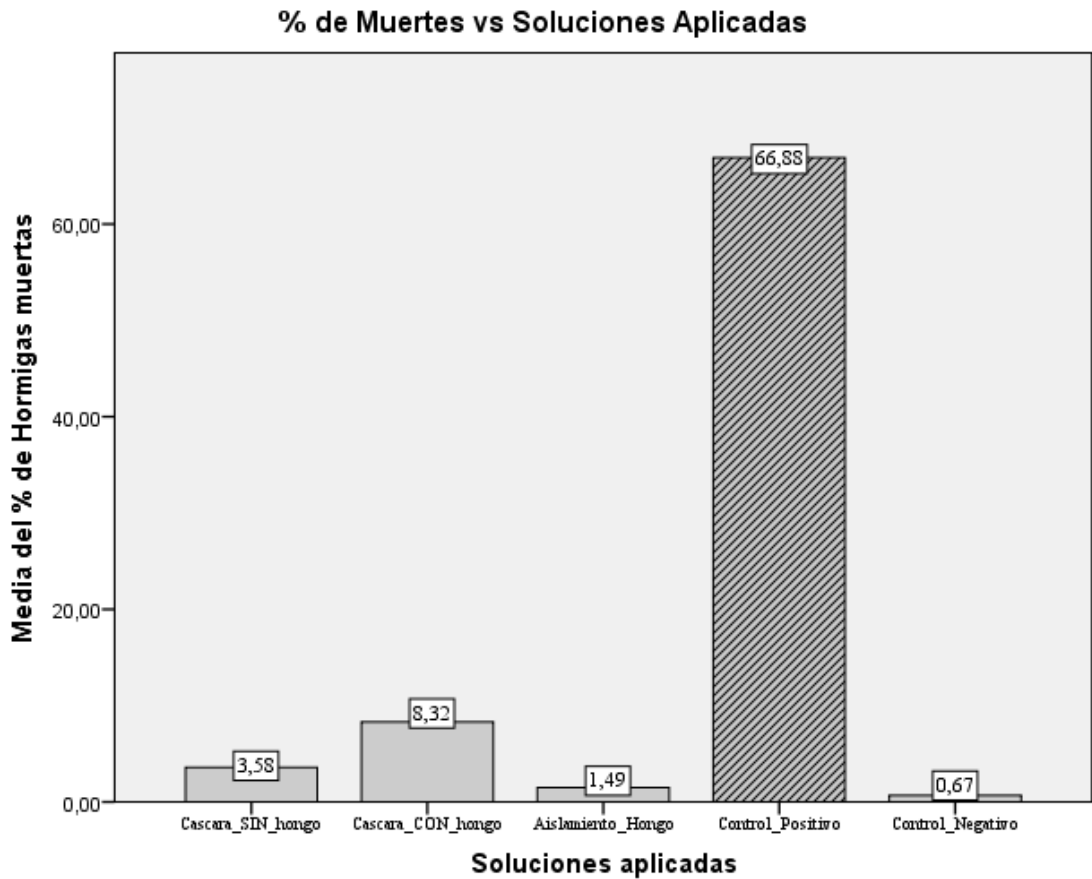


Gráfico 2-3: Porcentaje de Muertes vs Soluciones Aplicadas
 Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

3.1.3.3. Concentración más adecuada

Una vez determinada que la solución Th presenta mayores valores en cuanto al resultado del porcentaje de repelencia, se realiza una comparación mediante las pruebas de ANOVA de un factor, para encontrar valores que determinen la concentración más efectiva en tanto a la repelencia sobre las hormigas.

Tabla 11-3: Pruebas ANOVA para las concentraciones de la solución Th

Porcentaje de Repelencia

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1109,231	2	554,616	8,557	,002
Dentro de grupos	1555,573	24	64,816		
Total	2664,805	26			

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

Planteamiento de la hipótesis

H₀: No existen diferencias significativas en el porcentaje de repelencia por efecto de la concentración de la solución aplicada. $p \geq 0,05$

H_i: Existen diferencias entre el porcentaje de repelencia por efecto de la concentración de la solución aplicada. Al menos una concentración es diferente. $p \leq 0,05$

Decisión

Estadísticamente se rechaza la hipótesis nula debido a que el nivel de significancia $p=0,002$ siendo menor a $0,05$. Se acepta la hipótesis alternativa H_i , lo que significa que existen diferencias significativas entre las medias las concentraciones de la solución aplicada, por lo que al menos una de las concentraciones aplicadas es diferente. Se justifica realizar pruebas Post-Hoc para encontrar subconjuntos homogéneos y realizar comparaciones.

Tabla 12-3: Subconjuntos homogéneos del % de repelencia de Th frente a la concentración aplicada

HSD Tukey^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto	
		1	2
Al_25%	9	61,2711	
Al_50%	9	65,6056	
Al_100%	9		76,5067
Sig.		,498	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 64,816.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000.

b. Alfa = 0,05.

Realizado por: Tatiana Dávila. 2018

En la Tabla 12-3 se muestra homogeneidad en las concentraciones de la solución Th al 25% y 50% a partir del hongo asilado. La concentración al 100% muestra un resultado diferente al situarse en un grupo aparte.

Discusión

La presente investigación tuvo como objetivo general determinar si los hongos presentes en las soluciones acuosas preparadas a partir de las cáscaras de naranjas, tienen un efecto insecticida o repelente sobre hormigas. Se tomó en cuenta la investigación previa de los hongos presentes en la cáscara de naranja, los cuales son llamados fitopatógenos porque generan enfermedades en las plantas en las que se hospedan.

En el intercambio de conocimientos por parte de los agricultores de la finca orgánica del Chontal, se conoció que usan solamente las naranjas que tienen la presencia de moho verde en sus cortezas, cuyas colonias fueron identificadas como *Penicillium* spp tras la caracterización de los hongos presentes en las soluciones (género encargado de la llamada pudrición verde en cítricos). Por medio de la investigación y experimentación se determinó que el hongo por si solo, no presenta un efecto repelente ni insecticida sobre las hormigas, debido a que el género *Penicillium* no se encuentra dentro del grupo de hongos entomopatógenos. En los días de experimentación no se observó ni una sola hormiga con crecimiento típico de los hongos entomopatógenos, como lo muestra la Figura 1-1.

Ciertas plantas y frutos como los cítricos tienen un efecto repelente en sus cortezas, lo que les ayuda a no ser devoradas por predadores, plagas o patógenos específicos. (Rodríguez et al, 2013). Lo que demuestra el resultado de las soluciones preparadas a partir de las cáscaras de naranjas sin presencia de las esporas de hongos, debido al efecto repelente que presentan naturalmente.

El mayor porcentaje de repelencia fue el provocado por las soluciones preparadas a partir de las cáscaras de naranjas con presencia de esporas de hongos (Th), obteniendo una media del 67,79%. Esto se explica en la composición de la cáscara de naranja y la acción de los hongos sobre la misma. Los monoterpenos son los principales componentes de las glándulas del aceite esencial de las cortezas de los cítricos como la naranja. El D-limoneno es el más abundante (Rodríguez et al, 2011), es cual da el olor característico a las frutas cítricos, estos olores fuertes provocan un efecto repelente hacia los insectos. Los estudios realizados por Dugo & Di Giacomo (2002) indican que el contenido de D-limoneno, aumenta drásticamente cuando la fruta verde desarrolla semillas y permanece en un alto nivel hasta que la fruta llega a estar completamente madura. La interacción del hongo *Penicillium digitatum* en la corteza de naranja, ayuda a liberar el etileno de la naranja, debido a que es la hormona que controla su

crecimiento, lo cual acelera su maduración. Por lo tanto las naranjas que son infectadas por hongos fitopatógenos del género *Penicillium* spp, requieren de un alto contenido de D-limoneno. Así pues, las naranjas en estado de maduración e infectadas por *Penicillium*, spp, expiden un mayor olor y por ende mayor grado de repelencia.

Por lo general las formulaciones de origen orgánico requieren que se las use con mayor frecuencia y por tanto en mayor cantidad. Esto se debe a que en su mayoría, no provocan la muerte de las plagas, solo una mayor repelencia en el lugar de aplicación, sea directamente en sus nidos o en los cultivos que se requiere proteger. Esto se evidenció en la experimentación en que las soluciones aplicadas con características repelentes (Tn y Th), no presentaron una actividad insecticida, con un porcentaje de muerte de 8,32% y 3,58%, contradictorio al del insecticida control del 66,88%.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación, permiten concluir que:

- Al preparar los extractos acuosos a partir de las cáscaras de naranjas provenientes de una finca orgánica del Chontal de la provincia de Imbabura, en condiciones de laboratorio, permiten de manera científica validar las técnicas ancestrales utilizadas por los agricultores para el control de las hormigas en los cultivos.
- La especie aislada de los hongos presentes en las soluciones preparadas corresponde al género *Penicillium* spp que son especies que están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se hallan en el suelo, la vegetación caída, y conidios en el aire. Este hallazgo tiene coherencia si se considera que las naranjas recolectadas presentaban en su corteza infecciones producidas por hongos y la presencia de esporas verdes, además los ejemplares tomados para el estudio fueron aquellos que se hallaban caídos en el suelo, alrededor de los árboles de naranja.
- El extracto acuoso preparado a partir de las cáscaras de naranjas infectadas por hongos registró una mayor actividad repelente sobre las hormigas, lo que difiere de los insecticidas químicos que provocan la muerte tanto de las plagas que afectan los cultivos, como de los organismos benéficos, además que provocan daños al medio ambiente y a la salud humana y animal.

Las soluciones preparadas a partir del aislamiento de los hongos presentes en la cáscara de naranja, por si solos no presentan actividad alguna sobre las hormigas, debido a que las especies del género *Penicillium* no han sido catalogadas como entomopatógenas.

Ninguna de las soluciones preparadas presentó efecto insecticida, lo que permite afirmar que las soluciones con cáscara de naranja, independiente de la presencia del hongo, tienen efecto repelente contra las hormigas.

- Los residuos de cáscara de la naranja son una alternativa válida para la formulación de repelentes naturales, sobre hormigas. Protegiendo de manera natural los cultivos, y evitando daños letales para la naturaleza. Además se logra el aprovechamiento de los residuos generados en el mismo sitio de producción

RECOMENDACIONES

- Es importante que como profesionales de la biotecnología, se amplíen las investigaciones en la búsqueda de métodos para la protección natural de cultivos aprovechando para ello la amplia variedad de alternativas que ofrece la naturaleza para la protección de cultivos.
- Por la acción repelente de la solución preparada, es necesario recomendar la aplicación periódica del producto a fin de disuadir y eliminar de manera paulatina a las hormigas que atacan las plantaciones de naranja.
- Investigar otros productos que en base a conocimientos ancestrales han sido usados no solo para combatir a las hormigas sino a otros insectos que provocan daños a los cultivos y de manera científica valorizar estas prácticas.
- Realizar investigaciones a largo plazo, para las dosis, tiempo y frecuencia de aplicación del repelente preparado a partir de cáscaras de naranjas infectadas.

BIBLIOGRAFÍA

ABDELMALEK & SALAHELDIN, "Silver Nanoparticles as a Potent Fungicide for Citrus Phytopathogenic Fungi" *J Nanomed Res* [En línea], 3(5): 00065. (2016). [Consulta: 28 Enero 2018] ISSN: 2377-4282. DOI:10.15406/jnmr.2016.03.00065 Disponible en: <http://medcraveonline.com/JNMR/JNMR-03-00065.php>

ARIAS, Pamela. *Análisis Descriptivo del Módulo Ambiental – Uso de Plaguicidas en la Agricultura*. Quito-Ecuador. 2013. [En línea]. [Consulta: 28 Enero 2018] Disponible en: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/plaguicidas/Plaguicidas-2013/Documento_Tecnico-Uso_de_Plaguicidas_en_la_Agricultura_2013.pdf

AUGUSTYNIUK-KRAM Anna & KRAM Karol J. "Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests" (Review), *Forest Ecosystems - More than Just Trees*. 2001 pp.265-294. ISBN 978-953-51-0202-1

BADII, M. H. Y J. L. ABREU DAENA, "Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control)" [En línea], *International Journal of Good Conscience*. 1(1): 82-89. 2006. [Consulta: 9 Enero 2018] ISSN 1870-557X. Disponible en: www.daenajournal.org

CABRERA, R., et al., "Evaluación de dos insecticidas naturales y un químico en el control de plagas en el cultivo de frejol en el litoral ecuatoriano" *IDESIA* [en línea], 2016, (Chile) 34 (5), pp. 27-35. [Consulta: 10 Enero 2018] Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/2016nahead/aop2516.pdf>

CACCIONI, D. R. L., et al., "Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*." *Int. J. Food Microbiology*, 1998, 43(1/2), pp. 73-79

COTO, Daniel & SAUNDERS, Joseph. *Insectos plagas de cultivos perennes con énfasis en frutales en América Central*. [En línea]. Turrialba-Costa Rica: Centro Agronómico de

Investigación y enseñanza. Guácimo-Costa Rica: Universidad EARTH, 2004. [Consulta: 13 de Octubre del 2017]. Disponible en:

[https://books.google.com.ec/books?id=TvW4euuVjwC&pg=PA5&dq=plagas+cultivos&hl=es](https://books.google.com.ec/books?id=TvW4euuVjwC&pg=PA5&dq=plagas+cultivos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjR-)

[Nyvwa3ZAhWHON8KHwB5A2UQ6AEIJAA#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=TvW4euuVjwC&pg=PA5&dq=plagas+cultivos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjR-Nyvwa3ZAhWHON8KHwB5A2UQ6AEIJAA#v=onepage&q&f=false)

CUERVO, et al. Fitopatología Manual De Prácticas De Ingeniería Agrícola. *Fitopatología*, 2002, vol. 86, pp. 7-86

.

DAVIDSON, Nita A., "Least-toxic alternatives for toxic alternatives for argentine ants, fleas, and white grubs of lawns", [En línea], *Report Number PM-01-02*, Pest Management Assessment, 2001. [Consulta: 9 Enero 2018] Disponible en:

http://apps.cdpr.ca.gov/schoolipm/managing_pests/74_antgrub.pdf

DREISTADT, Steve H. *Integrated Pest Management for Floriculture and Nurseries*. [En línea]. University of California Agriculture and Natural Resources, 2001. [Consulta: 20 de Octubre del 2017]. Disponible en:

<https://books.google.com.ec/books?id=w1s6Tmbu72kC&pg=PA191&dq=ants+pests&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjf->

[pbxya3ZAhUm6oMKHSvVD2kQ6AEINDAC#v=onepage&q=ants%20pests&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=w1s6Tmbu72kC&pg=PA191&dq=ants+pests&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjf-pbxya3ZAhUm6oMKHSvVD2kQ6AEINDAC#v=onepage&q=ants%20pests&f=false)

DYAKOV, Yuri; et al. *Comprehensive and Molecular Phytopathology*. [En línea]. Studies in Plant Science, 2007. [Consulta: 24 de Octubre del 2017]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521323500237>

ESPTIA, Carmen R. Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas (*Cymbopogon citratus* y *Tagetes lucida*) utilizados contra *tribolium castaneum* herbst. (Coleoptera: tenebrionidae) (Tesis) (Maestría) [En línea] Universidad Nacional de Colombia. Cartajena de Indias-Colombia, 2011. Disponible en:

<https://core.ac.uk/download/pdf/11054331.pdf>

FROUZ, Jan; et al. "The effect of *Lasius niger* (Hymenoptera, Formicidae) ant nest on selected soil chemical properties". *Pedobiologia* [En línea], 2003, (Czech Republic) 47(39), 205-212. [Consulta: 20 de Octubre del 2017]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031405604701936>

GONZALES, Luis C. *Introducción a la fitopatología*. San José-Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1976.

GÓMEZ, H., et al., manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. *Senesa* [en línea]. 2014 Lima: Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2017/09/Manual-de-Producción-y-Uso-de-Hongos-Entomopatógenos.pdf>.

GUILLADE, A. C., "Control biológico de hormigas cortadoras de hoja (*FORMICIDAE: ATTINI*) mediante parasitoides (*DIPTERA: PHORIDAE*)" [En línea], (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. 2017 [Consulta: 9 Enero 2018] RIDAA Disponible en: <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/412>

HÖLLDOBLER, Bert. & WILSON, Edward O. *The Ants*. New York: Harvard Univ Pr, 1990.

JIMÉNEZ, Eduardo. *Plagas de Cultivos*. [En línea]. Managua-Nicaragua: Universidad Nacional Agraria: 2016. [Consulta: 13 de Octubre del 2017]. Disponible en: <http://repositorio.una.edu.ni/3348/1/NH10J61pc.pdf>

KHACHATOURIANS & QAZI, "Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and Molecular Biology" *Human and Animal Relationships* [En línea], 2008 (pp.33-61) [Consulta: 28 Enero 2018] DOI 10.1007/978-3-540-79307-6_3 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/226262758_Entomopathogenic_Fungi_Biochemistry_and_Molecular_Biology

LACEY, et al., "Insect pathogens as biological control agents: Back to the future" *Journal of Invertebrate Pathology* [En línea], 2015. Vol. 132, pp.1-41 [Consulta: 28 Enero 2018] DOI: 10.1016/j.jip.2015.07.009 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/280584213_Insect_pathogens_as_biological_control_agents_Back_to_the_future

LEÓN, Jorge. *Botánica de los cultivos Tropicales*. [En línea]. Tercera Edición. San José-Costa Rica: Editorial Agromérica, 2000. [Consulta: 15 de enero 2018]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=NBtu79LJ4h4C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

LIND A.; et al. “Development and control of mound nests of black garden ant (*Lasius niger*) in farmland” *Agronomy Research*. [En línea], 2006, (United State of America). 4(Special Issue), pp. 269-272. [Consulta: 20 de Octubre del 2017]. Disponible en: <<http://agronomy.emu.ee/vol04Spec/p4S30.pdf>>

LOPEZ Arismendy, ELKIN, PERALTA Sergio, “*Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* controlan colonias de *Atta cephalotes* en campo mejor que un insecticida químico” *Revista Colombiana de Biotecnología*, Colombia. Vol.1, 2001 pp. 71-78.

MONTAÑA, M., et al. *Causas y efectos del mal manejo de los insecticidas Sobre la Salud del agricultor*. [En línea]. 2009. *Revista Científica Juvenil*, vol. 7-8, pp. 183-188. [Consulta: 20 de Octubre del 2017]. Disponible en: <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/creando/article/view/1681/1643>

MONZÓN, A., Producción y uso de hongos entomopatógenos. *Fundación para el desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua*, 2001. pp. 63.

MURRAY, Todd, et al, Natural Insecticides, *Pacific Northwest Extension* - PNW649. [En línea], 2013 [Consulta: 12 Enero 2018] Disponible en: <http://agresearch.montana.edu/wtarc/producerinfo/entomology-insect-ecology/Biopesticides/NaturalInsecticides.pdf>

NATIONAL GEOGRAPHIC. *Hormiga*. [En línea]. España: Redacción National Geographic, 2010. [Consulta: 20 de Octubre del 2017]. Disponible en: <http://www.nationalgeographic.es/animales/hormiga>

OBOH, G., et al., “Phytoparasitica” (2017) vol. 45: 501. <https://doi.org/10.1007/s12600-017-0620-z>

OCHOA, J.; et al. “Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, México” *Ciencia y Tecnología Alimentaria* [En línea] 2007, 5 [Fecha de consulta: 7 de abril de 2018] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=72450505>> ISSN 1135-8122

OWNLEY, B.H. & TRIGIANO., *Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises*. Third Edit. New York: CRC Press. 2016 ISBN 978-1466500815.

PALAZZOLO, Laudicina & GERMANÀ, "Current and Potential Use of Citrus Essential Oils" *Current Organic Chemistry*, [En línea], (2013), Vol. 17, No. 24, pp.3042-3049. [Consulta: 12 Enero 2018] DOI: 1385-2728/13 \$58.00+.00. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/e823/105a684bcd539aac7da67a03df896c5656.pdf>

PALOU, Lluís, *Penicillium digitatum, Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold). *Postharvest Decay: Control Strategies*. 2014 pp.45-102. DOI: 10.1016/B978-0-12-411552-1.00002-8.

PATTERSON Richard S. & BRIAN Juan A., "Potential of three biological control agents for suppression of *solenopsis invicta*" *The Red Imported Fire Ant Proceedings of the First International Conference on Urban Pests*. 1993

PITT J.I., *Penicillium* and related genera. *Food Spoilage Microorganisms* - Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, [En línea], 2006 pp.437-450. [Consulta: 12 Enero 2018] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978185573966650016X>

RODRÍGUEZ, A., et al., Fruit aromas in mature fleshy fruits as signals of readiness for predation and seed dispersal. *New Phytologist* [en línea] 2013 197:36-48. [Consulta: 01 marzo 2018] Disponible en: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-8137.2012.04382.x>

SALAS, M., et al., EFICACIA DE INSECTICIDAS EN DIFERENTES PRESENTACIONES SOBRE LA POBLACIÓN DE *Pogonomyrmex barbatus* Smith (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). *Entomología Mexicana*, 2015. vol. 2, pp. 417-422.

SÁNCHEZ José & BERENGUER María José, "NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales" *Centro de Investigación y Asistencia Técnica* [en línea], 2015, (Barcelona) NIPO: 211-86-023-6. [Consulta: 5 Enero 2018] Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/101a200/ntp_143.pdf

SARANRAJ P. & JAYAPRAKASH Arul. "Agrobeneicial Entomopathogenic Fungi – *Beauveria Bassiana*: A Review" *Indo – Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR)*

[En línea], (2017) 3(2); pp.: 1051 – 1087. [Consulta: 28 Enero 2018] ISSN: 2454-1370. DOI: 10.22192/iajmr.2017.3.2.4. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/319302063_AGROBENEFICIAL_ENTOMOPATHOGENIC_FUNGI_-_Beauveria_bassiana_A_REVIEW

SAUNDERS, Joseph; et al. *Plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América central* [En línea]. Segunda edición. Turrialba-Costa Rica: Centro Agronómico de Investigación y enseñanza, 1998. [Consulta: 13 de Octubre del 2017]. Disponible en:
<https://books.google.com.ec/books?id=21RLT3WicLwC&pg=PR9&dq=plagas+cultivos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjR-Nyvwa3ZAhWHON8KHwb5A2UQ6AEIODAD#v=onepage&q=plagas%20cultivos&f=false>

SILVA Jorge & TORRES Patricia. Identificación De Hongos Fitopatógenos Y Presencia De Salmonella Sp En Compost De Plantas De Tratamiento. 2007. *Respuestas*, no. 1, pp. 12-19.

SZYMANSKY, S. “Magnetic Equivalence between Nuclei of Spin Greater than ½ in Presence of Relaxation”. *Journal of Magnetic Resonance* [en línea], 1997, (United State of America) 127(2), pp. 199-205. [Consulta: 20 agosto 2009]. ISSN 1090-7807. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1006/jmre.1997.1203>

TANGARIFE, V., *Penicillium spp. Aprende en línea Plataforma académica para pregrado y posgrado* [en línea]. 2011. Disponible en:
<http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100815>.

TIMMER, L., et al., “Fungal Diseases of Fruit and Foliage of Citrus Trees” In: Naqvi S.A.M.H. (eds) *Diseases of Fruits and Vegetables* [En línea], Vol.I. Springer, Dordrecht. 2004 Online ISBN: 978-1-4020-2606-5 DOI: https://doi.org/10.1007/1-4020-2606-4_3 [Consulta: 28 Enero 2018] Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-2606-4_3#citeas

VÁZQUEZ, Daniel, “Enfermedades de poscosecha en cítricos y su control” *Serie Documentos. EEA INTA Grupo THM, Concordia, Argentina.* [En línea], 2017 [Consulta: 28 Enero 2018] Disponible en: <http://agricultureros.com/wp-content/uploads/2017/03/140919-C%C3%ADtricos-Enf-V%C3%A1zquez-OK.pdf>

VOLODYMYROVYCH Oberemok, et al., “A short history of insecticides” *Journal Of Plant Protection Research* [En línea] Vol. 55, No. 3 (2015). pp. 221-226. [Consulta: 12 Enero 2018] Disponible en: [http://www.plantprotection.pl/PDF/55\(3\)/JPPR_55\(3\)_0R1_Oberemok.pdf](http://www.plantprotection.pl/PDF/55(3)/JPPR_55(3)_0R1_Oberemok.pdf)

YE, et al.; En: X. YE (ed.), *Phytochemicals in Citrus: Applications in Functional Foods* S.l.: s.n., ISBN 9781498742726. [En línea]. 2017. [Consulta: 20 de Octubre del 2017]. Disponible en:<https://books.google.com.ec/books?id=dvA0DwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>.

ANEXOS

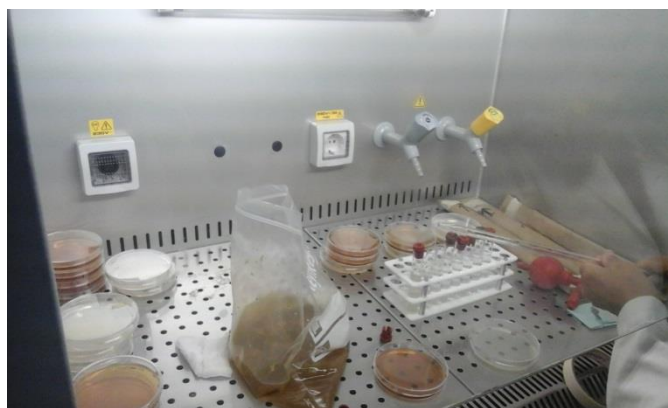
Anexo A: Recopilación fotográfica



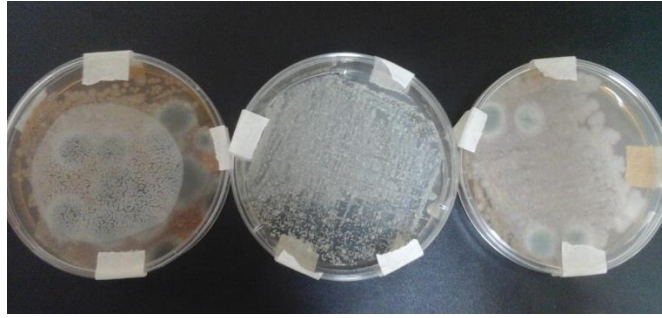
Fotografía 1A: Selección de muestras de naranjas



Fotografía 2A: Pruebas preliminares para la preparación de las soluciones



Fotografía 3A: Diluciones seriadas a partir de las soluciones de cáscaras de naranjas



Fotografía 4A: Desarrollo de colonias de *Penicillium* en agar SDA



Fotografía 5A: Asilamiento de *Penicillium* spp



Fotografía 6A: Soluciones preparadas a partir de las cáscaras de naranjas



Fotografía 7A: Finca orgánica



Fotografía 8A: Identificación de las rutas de hormigas hacia los hormigueros



Fotografía 9A: Aspersión de las soluciones sobre las rutas de hormigas

Anexo B: Gráficas adicionales

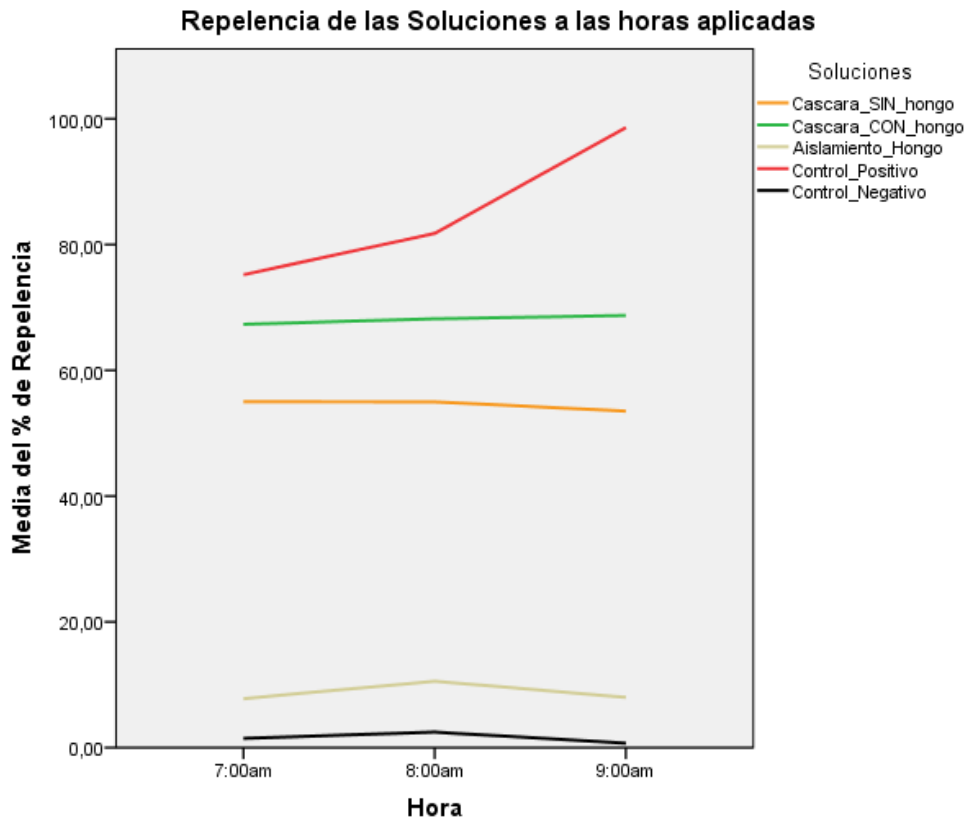


Gráfico 1B: Repelencia de las soluciones a las horas aplicadas

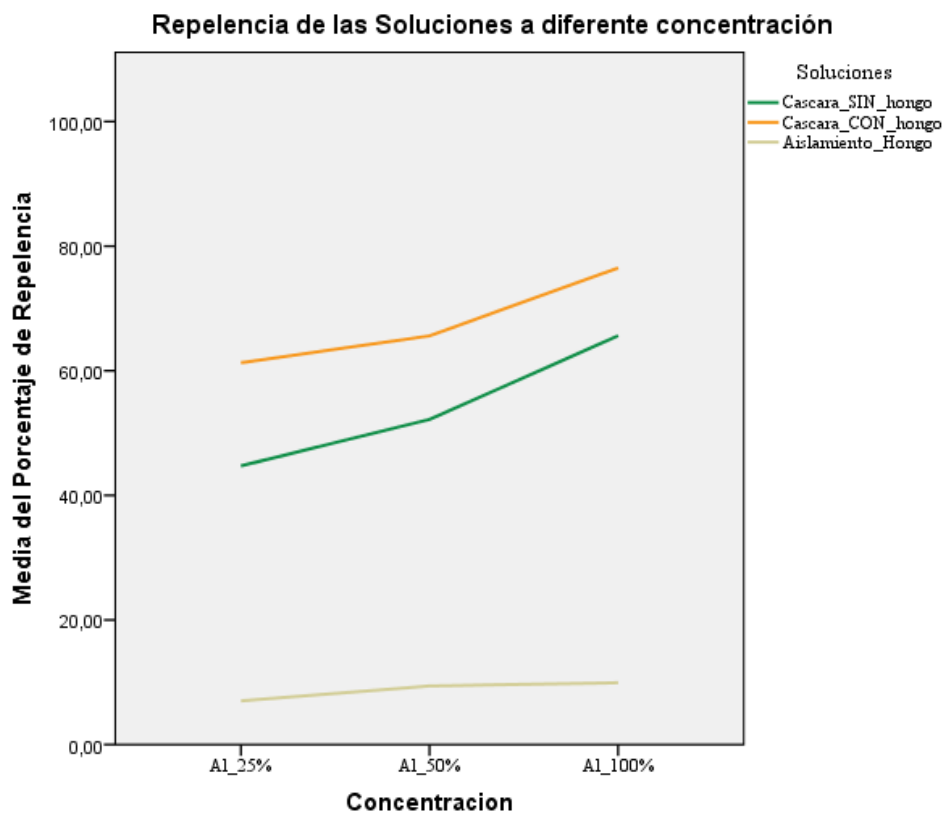


Gráfico 2B: Repelencia de las soluciones a diferentes concentraciones

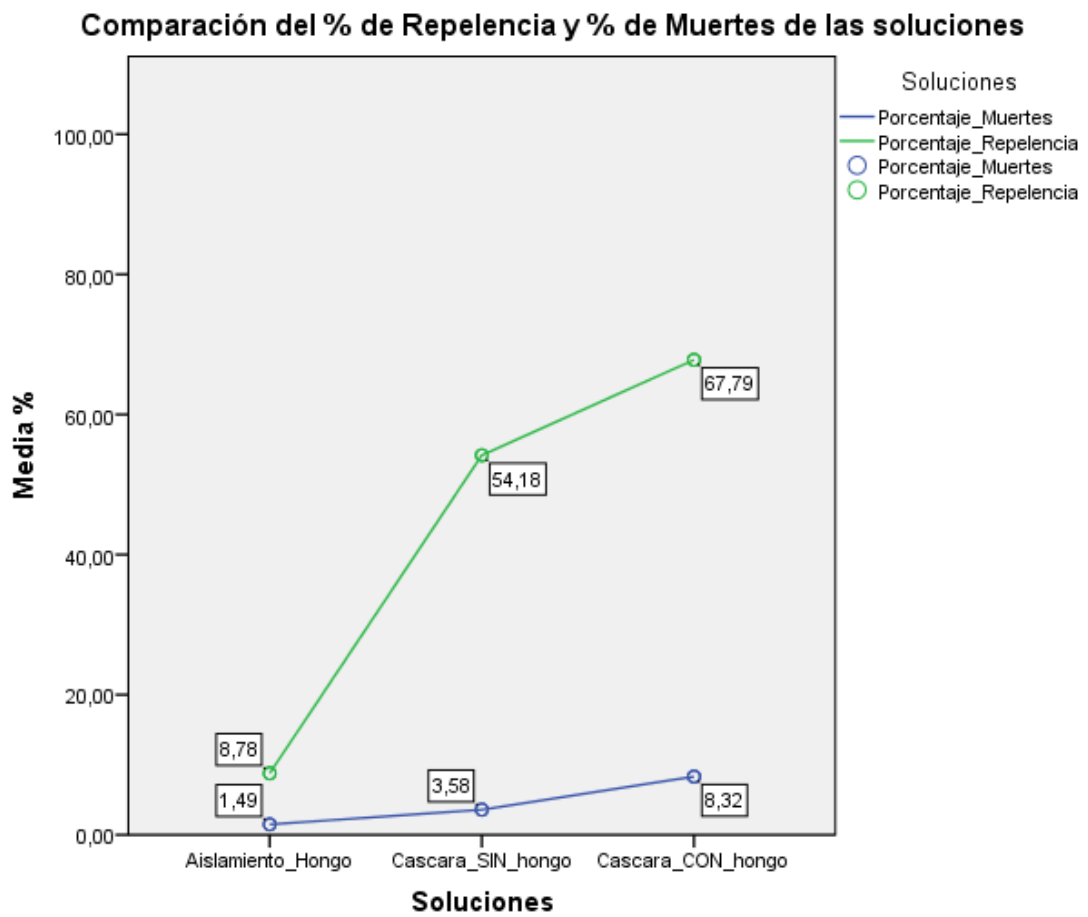


Gráfico 3B: Comparación del porcentaje de repelencia y el porcentaje de muertes de las 3 soluciones experimentales